

PCT/EP04/08624



**Bescheinigung**

**Certificate**

**Attestation**

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten internationalen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the international patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet international spécifiée à la page suivante.

Den Haag, den  
The Hague,  
La Haye, le

06. 09. 2004

Der Präsident des Europäischen Patentamts  
Im Auftrag  
For the President of the European Patent Office  
Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

  
R. Casimir

Patentanmeldung Nr.  
Patent application no.  
Demande de brevet n°

PCT/EP 03/09105



Anmeldung Nr.:  
Application no.:  
Demande n°:

PCT/EP 03/09105

Anmelder:  
Applicant(s):  
Demandeur(s):

1. SUNGENE GMBH & CO. KGAA - Gatersleben, Deutschland
2. SCHOPFER, Christel Renate - Quedlinburg, Deutschland (nur US)
3. FLACHMAN, Ralf - Quedlinburg, Deutschland (nur US)

Bezeichnung der Erfindung:

Title of the invention:

Titre de l'invention:

Verfahren zur Herstellung von Zeaxanthin und/ oder dessen biosynthetischen  
Zwischen- und/ oder Folgeprodukten

Anmeldetag:

Date of filing:

Date de dépôt:

18. August 2003 (18.08.2003)

In Anspruch genommene Priorität(en)

Priority(ies) claimed

Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:

State:

Pays:

Deutschland

Tag:

Date:

Date: 13. November 2002

(13.11.2002)

Aktenzeichen:

File no.

Numéro de dépôt:

10253112.9

Benennung von Vertragsstaaten : Siehe Formblatt PCT/RO/101 (beigefügt)

Designation of contracting states : See Form PCT/RO/101 (enclosed)

Désignation d'états contractants : Voir Formulaire PCT/RO/101 (ci-joint)

Bemerkungen:

Remarks:

Remarques:

Weitere Anmelder:

4. HERBERS, Karin - Quedlinburg, Deutschland (nur US)
5. KUNZE, Irene - Gatersleben, Deutschland (nur US)
6. SAUER, Matt - Quedlinburg, Deutschland (nur US)
7. KLEBSATTEL, Martin - Quedlinburg, Deutschland (nur US)

Weitere Prioritätsansprüche:

Deutschland

16. Dezember 2002  
(16.12.2002)

10258971.2

**Weitere Prioritätsansprüche:**

<b>Deutschland</b>	<b>20. August 2002 (20.08.2002)</b>	<b>10238980.2</b>
<b>Deutschland</b>	<b>20. August 2002 (20.08.2002)</b>	<b>10238978.0</b>
<b>Deutschland</b>	<b>20. August 2002 (20.08.2002)</b>	<b>10238979.9</b>

## PCT-ANTRAG

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 07.08.2003 01:42:12 PM

IV-1	<b>Anwalt oder gemeinsamer Vertreter; oder besondere Zustellanschrift</b> Die unten bezeichnete Person ist/wird hiermit bestellt, um den (die) Anmelder vor den internationalen Behörden zu vertreten, und zwar als:	<b>Anwalt</b>
IV-1-1	Name (FAMILIENNAME, Vorname)	DÖRPER, Thomas
IV-1-2	Anschrift:	c/o BASF Aktiengesellschaft  D-67056 Ludwigshafen Deutschland
IV-1-3	Telefonnr.	0621/60-94182
IV-1-4	Telefaxnr.	0621/60-52538
V	<b>Bestimmung von Staaten</b>	
V-1	Regionales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW und jeder weitere Staat, der Mitgliedstaat des Harare-Protokolls und Vertragsstaat des PCT ist EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM und jeder weitere Staat, der Mitgliedsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist EP: AT BE BG CH&LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL PT RO SE SI SK TR und jeder weitere Staat, der Mitgliedsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG und jeder weitere Staat, der Mitgliedstaat der OAPI und Vertragsstaat des PCT ist
V-2	Nationales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NI NO NZ OM PG PH PL PT RO RU SC SD SE SG SK SL SY TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM ZW

Verfahren zur Herstellung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten

5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten durch Kultivierung von genetisch veränderten Pflanzen die im Vergleich zum Wildtyp eine durch doppelsträngige  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenzen verursachte reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen, die genetisch veränderten Pflanzen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von Carotinoidextrakten.

15 Carotinoide, wie beispielsweise Lycopin, Lutein,  $\beta$ -Carotin oder Zeaxanthin werden de novo in Bakterien, Algen, Pilzen und Pflanzen synthetisiert. Ketocarotinoide, also Carotinoide, die mindestens eine Keto-Gruppe enthalten, wie beispielsweise 20 Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin sind natürliche Antioxidantien und Pigmente, die von einigen Algen und Mikroorganismen als Sekundärmetabolite produziert werden.

25 Aufgrund ihrer farbgebenden Eigenschaften werden die Carotinoide als Pigmentier- und Pigmentierhilfsstoffe eingesetzt. Zeaxanthin und Lutein finden beispielsweise bei der Eidotterpigmentierung Verwendung,  $\beta$ -Carotin dient als Orange-Pigment in Lebensmitteln und Getränken, Astaxanthin wird als Pigmentierhilfsstoff in der 30 Tierernährung, insbesondere in der Forellen-, Lachs- und Shrimpszucht verwendet.

Darüber hinaus finden die Carotinoide, wie beispielsweise Lutein, Zeaxanthin, Lycopin,  $\beta$ -Carotin und Astaxanthin, aufgrund ihrer 35 antioxidativen Eigenschaften Anwendung bei der Supplementierung in der Human- und Tierernährung zur Therapie und Vorbeugung von Krankheiten.

Ein wirtschaftliches, biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von natürlichen Carotinoiden ist von großer Bedeutung.

Aus WO 00/32788 ist es bekannt durch kombinierte Überexpression von Carotinoid-Biosynthesegenen und Antisense-Verfahren bestimmte Carotinoidverhältnisse in Tagetespetalen zu beeinflussen.

Das in WO 00/32788 offenbarte Verfahren liefert zwar genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp einen veränderten Gehalt an Carotinoiden aufweisen, weist jedoch den Nachteil auf, dass die Höhe des Gehalts an Carotinoiden des "β-Carotinoid-Weges", wie beispielsweise β-Carotin oder Zeaxanthin und die Reinheit dieser Carotinoide und damit das Verhältnis an Carotinoiden des "β-Carotinoid-Weges", wie beispielsweise β-Carotin oder Zeaxanthin zu den Carotinoiden des "α-Carotinoid-Weges", wie beispielsweise α-Carotin oder Lutein noch nicht zufriedenstellend ist.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde ein alternatives Verfahren zur Herstellung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten durch Kultivierung von Pflanzen zur Verfügung zu stellen, bzw. weitere transgene Pflanzen, die Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten herstellen, zur Verfügung zu stellen, die optimierte Eigenschaften, wie beispielsweise einen höheren Gehalt an Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten im Verhältnis zu Carotinoiden des "α-Carotinoid-Weges" aufweisen und den geschilderten Nachteil des Standes der Technik nicht aufweisen.

Demgemäß wurde ein Verfahren zur Herstellung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten durch Kultivierung von genetisch veränderten Pflanzen gefunden, die im Vergleich zum Wildtyp eine durch doppelsträngige ε-Cyclase-Ribonukleinsäuresequenzen verursachte reduzierte ε-Cyclase-Aktivität aufweisen.

Unter ε-Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer ε-Cyclase verstanden.

Unter einer ε-Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen ε-Ionon-Ring zu überführen.

Unter einer ε-Cyclase wird daher insbesondere ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Lycopin in δ-Carotin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter ε-Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein ε-Cyclase umgesetzte Menge Lycopin bzw. gebildete Menge δ-Carotin verstanden.

## 3

Bei einer reduzierten  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\epsilon$ -Cyclase die umgesetzte Menge Lycopin bzw. die gebildete Menge  $\delta$ -Carotin reduziert.

5

Unter einer reduzierten  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität wird vorzugsweise die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität einer  $\epsilon$ -Cyclase in einer pflanzlichen

10 Zelle, Pflanze oder einem davon abgeleiteten Teil, Gewebe, Organ, Zellen oder Samen verstanden.

Die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in Pflanzen gegenüber dem Wildtyp kann beispielsweise durch Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Pro-

15 teinmenge, oder der  $\epsilon$ -Cyclase-mRNA-Menge in der Pflanze erfolgen. Dementsprechend kann eine gegenüber dem Wildtyp reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität direkt bestimmt werden oder über die Bestimmung der  $\epsilon$ -Cyclase-Proteinmenge oder der  $\epsilon$ -Cyclase-mRNA-Menge der erfindungsgemäßen Pflanze im Vergleich zum Wildtyp erfolgen.

20

Eine Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung einer  $\epsilon$ -Cyclase bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen der  $\epsilon$ -Cyclase (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbar-

25 keit der  $\epsilon$ -Cyclase). Vorzugsweise wird die  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität (bzw. die  $\epsilon$ -Cyclase-Proteinmenge oder die  $\epsilon$ -Cyclase-mRNA-Menge) in der Pflanze, besonders bevorzugt in Blüten im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um 100 % reduziert. Insbesondere meint „Reduzierung“ auch das vollständigen

30 Fehlen der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität (bzw. des  $\epsilon$ -Cyclase-Proteins oder der  $\epsilon$ -Cyclase-mRNA).

Die Bestimmung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

35

Die  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität kann nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) *in vitro* bestimmt werden,

40 wenn zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Kaliumphosphat als Puffer (ph 7.6), Lycopin als Substrat, Stromaprotein von Paprika, NADP+, NADPH und ATP zugegeben werden.

Die Bestimmung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt besonders bevorzugt nach Bouvier, d'Harlingue und Camara

45

(Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

Der in-vitro Assay wird in einem Volumen von 0.25 ml durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Pflanzenextrakt, 20 nM Lycopin, 0.25 mg an chromoplastidärem Stromaprotein aus Paprika, 0.2 mM NADP<sup>+</sup>, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 0.01 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15). Eine weitere analytische Methode ist beschrieben in Beyer, Kröncke und Nievelstein (On the mechanism of the lycopene isomerase/cyclase reaction in *Narcissus pseudonarcissus* L. chromoplast,; J. Biol. Chem. 266(26) (1991) 17072-17078).

Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff "Pflanze" die Ausgangspflanze (Wildtyp) oder eine erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanze oder beides verstanden werden.

Vorzugsweise und insbesondere in Fällen in denen die Pflanze oder der Wildtyp nicht eindeutig zuordenbar ist, wird unter "Wildtyp" für die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und die Erhöhung des Gehalts an Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten eine Referenzpflanze verstanden.

Diese Referenzpflanze ist *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Tagetes lucida*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri*, *Tagetes minuta* oder *Tagetes campanulata*, besonders bevorzugt *Tagetes erecta*.

Im erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität durch Einbringen mindestens einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen.

Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA gegen ein  $\epsilon$ -Cyclase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen wie die Promotorsequenz) oder ein  $\epsilon$ -Cyclase-Transkript (also mRNA-Sequenzen) gerichtet ist.



Unter genetisch veränderten Pflanzen die im Vergleich zum Wildtyp eine durch doppelsträngige  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenzen verursachte reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen, wird erfindungsgemäß verstanden, dass die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität durch die Verwendung von doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenzen erfolgt. Dieses Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA ("double-stranded RNA interference", auch als dsRNA-Verfahren bezeichnet) ist an sich bekannt und beispielsweise in Matzke MA et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire A. et al (1998) Nature 391:806-811; WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/68374; WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035 oder WO 00/63364 beschrieben. Auf die in den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

Unter „Doppelsträngiger Ribonukleinsäuresequenz“ wird erfindungsgemäß eine oder mehr Ribonukleinsäuresequenzen, die aufgrund komplementärer Sequenzen theoretisch, beispielsweise gemäß den Basenpaarregeln von Watson und Crick und/oder faktisch, beispielsweise aufgrund von Hybridisierungsexperimenten, in vitro und/oder in vivo in der Lage sind, doppelsträngige RNA-Strukturen auszubilden.

Dem Fachmann ist bewußt, dass die Ausbildung von doppelsträngigen RNA-Strukturen, einen Gleichgewichtszustand darstellt. Bevorzugt ist das Verhältnis von doppelsträngigen Molekülen zu entsprechenden dissoziierten Formen mindestens 1 zu 10, bevorzugt 1:1, besonders bevorzugt 5:1, am meisten bevorzugt 10:1.

Unter einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz oder auch  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA wird vorzugsweise ein RNA-Molekül verstanden, das einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

- a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder
- b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.

Im erfindungsgemäßen Verfahren bringt man daher zur Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität bevorzugt in die Pflanze eine RNA ein, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

- a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder
- b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.

Unter dem Begriff „ $\epsilon$ -Cyclase-Transkript“ wird der transkripierte Teil eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens verstanden, der neben der  $\epsilon$ -Cyclase kodierenden Sequenz beispielsweise auch nichtkodierende Sequenzen, wie beispielsweise auch UTRs enthaelt.

Unter einer RNA, die „mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist“, ist vorzugsweise gemeint, dass die RNA-Sequenz mit mindestens einem Teil des theoretischen Transkriptes der  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz, also der entsprechenden RNA-Sequenz, identisch ist.

Unter „einem Teil“ des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts bzw. der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz werden Teilsequenzen verstanden, die von wenigen Basenpaaren bis hin zu vollstaendigen Sequenzen des Transkripts bzw. der Promotorsequenz reichen koennen. Die optimale Laenge der Teilsequenzen kann der Fachmann durch Routineversuche leicht ermitteln.

In der Regel betraegt die Laenge der Teilsequenzen mindestens 10 Basen und hoechstens 2 kb, bevorzugt mindestens 25 Basen und hoechstens 1,5 kb, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen und hoechstens 600 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Basen und hoechstens 500, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen und hoechstens 400 Basen.

Vorzugsweise werden die Teilsequenzen so ausgesucht, dass eine moeglichst hohe Spezifitaet erreicht wird und nicht Aktivitaeten anderer Enzyme reduziert werden, deren Verminderung nicht erwuenscht ist. Es ist daher vorteilhaft fuer die Teilsequenzen der  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA Teile des  $\epsilon$ -Cyclase Transkripts und/oder Teilsequenzen der  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenzen zu waehlen, die nicht in anderen Sequenzen auftreten.

In einer besonders bevorzugten Ausfuhrungsform enthaelt daher die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA eine Sequenz, die mit einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder das 3'-Ende der Pflanze eigenen Nukleinsaure, codierend eine  $\epsilon$ -Cyclase enthaelt. Insbesondere sind nichttranslatierte Bereiche im 5' oder 3' des Transkriptes geeignet, selektive Doppel-Strang-Strukturen herzustellen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich auf doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA-Moleküle), die bei Einbringen in einen pflanzlichen Organismus (oder eine davon abgeleitete Zelle, Gewebe, Organ oder Vermehrungsmaterial) die Verminderung einer  $\epsilon$ -Cyclase bewirken.

Ein doppelsträngiges RNA-Molekül zur Reduzierung der Expression einer  $\epsilon$ -Cyclase ( $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA) umfasst dabei bevorzugt

- 10 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil eines "sense"-RNA- $\epsilon$ -Cyclase Transkriptes, und
- 15 b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen, bevorzugt vollständig, komplementär ist.

In Bezug auf die dsRNA-Moleküle wird unter  $\epsilon$ -Cyclase-Nukleinsäuresequenz, bzw. das entsprechende Transkript bevorzugt die Sequenz gemäß SEQ. ID. NO. 4 oder ein Teil derselben verstanden.

"Im wesentlichen identisch" meint, dass die dsRNA Sequenz auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu der  $\epsilon$ -Cyclase Zielsequenz aufweisen kann und dennoch eine effizient Verminderung der Expression bewirkt. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 75 %, bevorzugt mindestens 80 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "sense"-Strang einer inhibitorischen dsRNA und mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens, bzw. zwischen dem "antisense"-Strang dem komplementären Strang eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens.

Eine 100 %ige Sequenzidentität zwischen dsRNA und einem  $\epsilon$ -Cyclase Gentranskript ist nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Verminderung der  $\epsilon$ -Cyclase Expression zu bewirken. Demzufolge besteht der Vorteil, dass das Verfahren tolerant ist gegenüber Sequenzabweichungen, wie sie infolge genetischer Mutationen, Polymorphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können.

40 So ist es beispielsweise möglich mit der dsRNA, die ausgehend von der  $\epsilon$ -Cyclase Sequenz des einen Organismus generiert wurde, die  $\epsilon$ -Cyclase Expression in einem anderen Organismus zu unterdrücken. Zu diesem Zweck umfasst die dsRNA bevorzugt Sequenzbereiche von  $\epsilon$ -Cyclase-Gentranskripten, die konservierten Bereichen entsprechen. Besagte konservierte Bereiche können aus Sequenzvergleichen leicht abgeleitet werden.

Alternativ, kann eine "im wesentlichen identische" dsRNA auch als Nukleinsäuresequenz definiert werden, die befähigt ist, mit einem Teil eines  $\epsilon$ -Cyclase Gentranskriptes zu hybridisieren beispielsweise in 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA bei 50°C oder 5 70°C für 12 bis 16 h).

"Im wesentlichen komplementär" meint, dass der "antisense"-RNA-Strang auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges auf-  
10 weisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 80 %, bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 100% zwischen dem "antisense"-RNA-Strang und dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges.

15 Zur Transformation der Pflanze mit einer  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA wird bevorzugt ein Nukleinsäurekonstrukt verwendet, das in die Pflanze eingebracht wird und das in der Pflanze in die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA transkribiert wird.

20 Daher betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Nukleinsäurekonstrukt, transkribierbar in

- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA- $\epsilon$ -Cyclase Transkriptes, und  
25
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.  
30

Diese Nukleinsäurekonstrukte werden im folgenden auch Expressionskassetten oder Expressionsvektoren genannt.

35 In einer weiteren Ausführungsform umfaßt die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA

- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes des Promotorbereichs eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens, und  
40
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.  
45

Vorzugsweise wird unter dem Promotorbereich einer  $\epsilon$ -Cyclase eine Sequenz gemäß SEQ. ID. NO. 13 oder ein Teil der selben verstanden.

5 Das entsprechende, bevorzugt zur Transformation der Pflanzen zu verwendende, Nukleinsäurekonstrukt, umfasst

a) einen "sense"-DNA-Strang der im wesentlichen identisch ist zu  
10 mindestens einem Teil des Promotorbereichs eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens, und

b) einen "antisense"-DNA-Strang, der zu dem DNA-"sense"-Strang  
unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.

15 Zur Herstellung der  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen und insbesondere deren Expressionskassetten zur Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität werden, insbesondere für *Tagetes erecta*, besonders bevorzugt die folgenden Teil-Sequenzen verwendet:

20 SEQ. ID. NO. 6: Sense-Fragment der 5'terminalen Region der  $\epsilon$ -Cyclase

SEQ. ID. No. 7: Antisense-Fragment der 5'terminalen Region der  
25  $\epsilon$ -Cyclase

SEQ. ID. No. 8: Sense-Fragment der 3'terminalen Region der  $\epsilon$ -Cyclase

30 SEQ. ID. No. 9: Antisense-Fragment der 3'terminalen Region der  $\epsilon$ -Cyclase

SEQ. ID. No. 13: Sense-Fragment des  $\epsilon$ -Cyclase-Promotors

35 SEQ. ID. No. 14: Antisense-Fragment des  $\epsilon$ -Cyclase-Promotors

Die dsRNA kann aus einem oder mehr Strängen von Polyribonukleotiden bestehen. Natürlich können, um den gleichen Zweck zu erreichen, auch mehrere individuelle dsRNA Moleküle, die jeweils einen  
40 der oben definierten Ribonukleotidsequenzabschnitte umfassen, in die Zelle oder den Organismus eingebracht werden.

Die doppelsträngige dsRNA-Struktur kann ausgehend von zwei komplementären, separaten RNA-Strängen oder - bevorzugt - ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären RNA-Strang  
45 gebildet werden. In diesem Fall sind "sense"-RNA-Strang und

"antisense"-RNA-Strang bevorzugt kovalent in Form eines invertierten "Repeats" miteinander verbunden.

Wie z.B. in WO 99/53050 beschrieben, kann die dsRNA auch eine Haarnadelstruktur umfassen, indem "sense"- und "antisense"-Strang durch eine verbindende Sequenz ("Linker"; beispielsweise ein Intron) verbunden werden. Die selbstkomplementären dsRNA-Strukturen sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression einer RNA-Sequenz erfordern und die komplementären RNA-Stränge stets in einem äquimolaren Verhältnis umfassen. Bevorzugt ist die verbindende Sequenz ein Intron (z.B. ein Intron des ST-LS1 Gens aus Kartoffel; Vancanneyt GF et al. (1990) Mol Gen Genet 220(2):245-250).

15 Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere Elemente beinhalten, wie beispielsweise Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale.

Ist die dsRNA jedoch gegen die Promotorsequenz einer  $\epsilon$ -Cyclase gerichtet, so umfaßt sie bevorzugt keine Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale. Dies ermöglicht eine Retention der dsRNA im Nukleus der Zelle und verhindert eine Verteilung der dsRNA in der gesamten Pflanze „Spreading“).

25 Sollen die zwei Stränge der dsRNA in einer Zelle oder Pflanze zusammengebracht werden, so kann dies beispielhaft auf folgende Art geschehen:

a) Transformation der Zelle oder Pflanze mit einem Vektor, der beide Expressionskassetten umfasst,

b) Kotransformation der Zelle oder Pflanze mit zwei Vektoren, wobei der eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

c) Kreuzung von zwei individuellen Pflanzenlinien, wobei die eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, die andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

Die Bildung der RNA Duplex kann entweder außerhalb der Zelle oder innerhalb derselben initiiert werden.

45 Die dsRNA kann entweder in vivo oder in vitro synthetisiert werden. Dazu kann eine DNA-Sequenz kodierend für eine dsRNA in eine Expressionskassette unter Kontrolle mindestens eines genetischen

## 11

Kontrollelementes (wie beispielsweise einem Promotor) gebracht werden. Eine Polyadenylierung ist nicht erforderlich, ebenso müssen keine Elemente zur Initiierung einer Translation vorhanden sein. Bevorzugt ist die Expressionskassette für die MP-dsRNA auf dem Transformationskonstrukt oder dem Transformationsvektor enthalten.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blüten die geringste Expressionsrate einer  $\epsilon$ -Cyclase aufweisen.

Dies wird bevorzugt dadurch erreicht, dass die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität blütenspezifisch, besonders bevorzugt blütenblattspezifisch erfolgt.

In der vorstehend beschriebenen, besonders bevorzugten Ausführungsform wird dies dadurch erreicht, dass die Transkription der  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors oder noch bevorzugter unter Kontrolle eines blütenblattspezifischen Promotors erfolgt.

In einer besonders bevorzugten -Ausführungsform erfolgt daher die Expression der dsRNA ausgehend von einem Expressionskonstrukt unter funktioneller Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors, besonders bevorzugt unter der Kontrolle des Promotors beschrieben durch SEQ. ID. NO. 10 oder eines funktionell äquivalenten Teils desselben.

Die Expressionskassetten kodierend für den "antisense"- und/oder den "sense"-Strang einer  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA oder für den selbstkomplementären-Strang der dsRNA, werden dazu bevorzugt in einen Transformationsvektor insertiert und mit den unten beschriebenen Verfahren in die pflanzliche Zelle eingebracht. Für das erfindungsgemäße Verfahren ist eine stabile Insertion in das Genom vorteilhaft.

Die dsRNA kann in einer Menge eingeführt werden, die zumindest eine Kopie pro Zelle ermöglicht. Höhere Mengen (z.B. mindestens 5, 10, 100, 500 oder 1000 Kopien pro Zelle) können ggf. eine effizienter Verminderung bewirken.

Die Methoden der dsRNA, der Kosuppression mittels sense-RNA und der "VIGS" ("virus induced gene silencing") werden auch als "post-transcriptional gene silencing" (PTGS) oder transcriptional gene silencing" (TGS) bezeichnet.

## 12

- In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Iliaceae oder Lamiaceae.
- 10 Besonders bevorzugt verwendet man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes, Acacia, Aconitum, Adonis, Arnica, Aquilegia, Aster, Astragalus, Bignonia, Calendula, Caltha, Campanula, Canna, Centaurea, Cheiranthus, Chrysanthemum, Citrus, Crepis, Crocus, Curcubita, Cytisus,
- 15 Delonia, Delphinium, Dianthus, Dimorphotheca, Doronicum, Eschscholtzia, Forsythia, Fremontia, Gazania, Gelsemium, Genista, Gentiana, Geranium, Gerbera, Geum, Grevilla, Helenium, Helianthus, Hepatica, Heracleum, Hibiscus, Heliopsis, Hypericum, Hypochoeris, Impatiens, Iris, Jacaranda, Kerria, Laburnum, Lathyrus,
- 20 Leontodon, Lilium, Linum, Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Marattia, Medicago, Mimulus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapsis, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Trigonopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder
- 25 Zinnia verwendet.

Ganz besonders bevorzugt verwendet man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Pflanzenarten Marigold, Tagetes erecta oder

30 Tagetes patula.

- Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genteilsch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, ein Ernten der Pflanzen und ein Isolieren von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten aus der Pflanze, besonders bevorzugt aus den Blütenblättern der Pflanzen angeschlossen.

40

Die transgenen Pflanzen werden in an sich bekannter Weise auf Nährböden gezogen und entsprechend geerntet.

- Die Isolierung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten aus den geernteten Blütenblättern erfolgt in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Trocknung und anschließender Extraktion und gegebenenfalls weitere
- 45



13

- rer chemischer oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie Rektifizierverfahren oder physikalische Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie. Die Isolierung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten aus den Blütenblättern erfolgt beispielsweise bevorzugt durch organische Lösungsmittel wie Aceton, Hexan, Ether oder tert.-Methylbutylether.
- 10 Weitere Isolierverfahren von Ketocarotinoiden, insbesondere aus Blütenblättern, sind beispielsweise in Egger und Kleinig (Phytochemistry (1967) 6, 437-440) und Egger (Phytochemistry (1965) 4, 609-618) beschrieben.
- 15 Vorzugsweise sind die biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten von Zeaxanthin ausgewählt aus der Gruppe Lycopin,  $\beta$ -Carotin, Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin, Violaxanthin, Antheraxanthin, Neoxanthin, Capsorubin, Capsanthin.
- 20 Unter biosynthetischen Zwischenprodukten von Zeaxanthin werden Carotinoide verstanden, die im Biosyntheseschema auf dem biochemischen Weg zu Zeaxanthin liegen. Vorzugsweise sind diese Zwischenprodukte Lycopin und/oder  $\beta$ -Carotin.
- 25 Unter biosynthetischen Folgeprodukten von Zeaxanthin werden Carotinoide verstanden, die im Biosyntheseschema von Zeaxanthin ableiten, wie beispielsweise Antheraxanthin, Violaxanthin und Neoxanthin. Unter biosynthetischen Folgeprodukten von Zeaxanthin
- 30 werden aber auch insbesondere solche Carotinoide verstanden, die sich beispielsweise durch Einbringen weiterer enzymatischer Aktivitäten in die Pflanze biosynthetisch von Zeaxanthin und dessen Zwischenprodukten ableiten lassen.
- 35 Beispielsweise kann durch Verursachung einer Ketolase-Aktivität in genetisch veränderten Pflanzen, beispielsweise durch Einbringen von Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase in eine Ausgangspflanzen, die genetisch veränderte Pflanze in die Lage versetzt werden, ausgehend von Carotinoiden des  $\beta$ -Carotinoid-Weges, wie
- 40 beispielsweise  $\beta$ -Carotin oder Zeaxanthin, Ketocarotinoide wie beispielsweise Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin oder Adonixanthin herzustellen.

Unter biosynthetischen Folgeprodukten von Zeaxanthin werden daher auch insbesondere Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin oder Adonixanthin verstanden.

5

Ein besonders bevorzugtes Folgeprodukt von Zeaxanthin ist Astaxanthin.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur  
10 Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, dass man Expressionskassetten, enthaltend ein vorstehend beschriebenes Nukleinsäurekonstrukt in eine Ausgangspflanze einführt.

15 Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor  
20 und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anord-  
25 nung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

30 Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Vektoren für Pflanzen und Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen, sowie die transgenen Pflanzen selbst beschrieben.

35 Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimen-  
40 ten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693-8711).

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder  
45 Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann.

## 15

"Konstitutiver" Promotor meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten.

5

Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt.

Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294;

10 Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985)

Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol

6:221-228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913;

Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202).

15 Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der pds Promoter (Pecker et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89:

4962-4966) oder der "Rubisco small subunit (SSU)"-Promotor

(US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677),

der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Dop-

20 pelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium,

der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649),

den Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689;

Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), den Smas Promotor,

25 holdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen

Proteins aus Weizen (WO 91/13991), der Pnit-Promoter

(Y07648.L, Hillebrand et al. (1998), Plant. Mol. Biol. 36, 89-99,

Hillebrand et al. (1996), Gene, 170, 197-200) sowie weitere

30 Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist.

Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997)

35 Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die Expression des Ketolase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten

Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B.

der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366),

durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein

40 durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186),

ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al.

(1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzier-

barer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclo-

hexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls

45 verwendet werden.

Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), der licht-induzierbare PPK Promotor oder der verwundungsinduzierte pinII-Promoter (EP375091).

- 10 Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, b-1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknes, et al. (1992) The Plant Cell
- 15 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Viral 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J
- 20 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968(1989).

- Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der
- 25 des pinII Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993)
  - 30 Plant Mol Biol 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) The Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.

- Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise Fruchtreifung-
- 35 spezifische Promotoren, wie beispielsweise der Fruchtreifungsspezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die Gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

- 40 Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Ketocarotinoiden bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Bevorzugt sind beispielsweise Promotoren
- 45 mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Petalen, Sepalen, Blüten, Blätter, Stengel und Wurzeln und Kombinationen hieraus.

Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren sind beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33) oder der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.

5 Blattspezifische Promotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EMBO J 8:2445-2451).

10

Blütenspezifische Promotoren sind beispielsweise der Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635), der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593) oder besonders bevorzugt die modifizierte Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298-10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711-1721).

15

Antheren-spezifische Promotoren sind beispielsweise der 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), den glob-1 Promotor oder  
20 der g-Zein Promotor.

Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben in Rogers et al. (1987) Meth in Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11 und Berger et al. (1989) Proc  
25 Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

Alle in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Promotoren ermöglichen in der Regel die Expression der doppelsträngige  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenzen in den erfindungsgemäßen  
30 Pflanzen.

Besonders bevorzugt im erfindungsgemäßen Verfahren und in den erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen sind blütenspezifische Promotoren.

35

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer vorstehend beschriebenen, eine doppelsträngige  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz transkribierende, Nukleinsäuresequenz und vorzugsweise  
40 einer zwischen Promotor und Nukleinsäure-Sequenz inserierten Nukleinsäure, die für ein plastidenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning:  
45 A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Har-

bor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

- 5 Die vorzugsweise insertierte Nukleinsäuren kodierend ein plastidäres Transitpeptid, gewährleisten die Lokalisation in Plastiden und insbesondere in Chromoplasten.

Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären *Nicotiana tabacum* Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco (rbcS) oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als auch der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem Äquivalent abgeleitet ist.

- 15 Besonders bevorzugt sind Nukleinsäure-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Kodon in der NcoI Schnittstelle:

20 pTP09

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC  
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA  
25 ATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG  
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGC GGGA  
TCC\_BamHI

30 pTP10

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC  
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA  
ATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG  
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGC GCTG  
35 GATCC\_BamHI

pTP11

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC  
40 CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA  
ATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG  
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGC GGGG  
ATCC\_BamHI

- 45 Weitere Beispiele für ein plastidäres Transitpeptid sind das Transitpeptid der plastidären Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) aus *Arabidopsis thaliana* und das Transitpep-

tid der kleinen Untereinheit der Ribulosebisphosphat Carboxylase (rbcS) aus Erbse (Guerineau, F, Woolston, S, Brooks, L, Mullineaux, P (1988) An expression cassette for targeting foreign proteins into the chloroplasts. Nucl. Acids res. 16: 11380).

5

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener

10 Organismen bestehen.

Beispiele für einen Terminator sind der 35S-Terminator (Guerineau et al. (1988) Nucl Acids Res. 16: 11380), der nos Terminator (Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. Nopa-

15 line synthase: transcript mapping and DNA sequence. J Mol Appl Genet. 1982;1(6):561-73) oder der ocs Terminator (Gielen, J, de Beuckeleer, M, Seurinck, J, Debroek, H, de Greve, H, Lemmers, M, van Montagu, M, Schell, J (1984) The complete sequence of the TL-DNA of the Agrobacterium tumefaciens plasmid pTiAch5. 20 EMBO J. 3: 835-846).

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, 25 Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primerrepair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.

Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können 30 komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus Agrobacterium tumefaciens, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

40

Die Übertragung von Nukleinsäuresequenzen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet.

Dazu können an sich bekannte Methoden zur Transformation und 45 Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt werden.

Geeignete Methoden zur Transformation von Pflanzen sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die  
5 Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der, vorstehend beschriebene, durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143  
10 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225) beschrieben.

Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor  
15 kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711) oder besonders bevorzugt pSUN2, pSUN3, pSUN4 oder pSUN5 (WO 02/00900).

20 Mit einer Expressionskassette transformierte Agrobakterien können in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

25 Zur bevorzugten Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, wird die fusionierte Expressionskassette in einen Vektor, beispielsweise pBin19 oder insbesondere pSUN5 kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium  
30 tumefaciens zu transformieren.

Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen verwendet werden, indem beispielsweise verwun-  
35 dete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Hig-  
40 her Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette  
45 integriertes Gen für die Expression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase enthalten.



21

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71-119 (1993) beschrieben.

- 10 Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pJIT117 (Guerineau et al. (1988) Nucl. Acids Res. 16 :11380),
- 15 pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

Die Erfindung betrifft ferner die genetisch veränderten Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine durch doppelsträngige  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenzen verursachte reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

Wie vorstehend erwähnt, enthält die genetisch veränderte Pflanze in einer bevorzugten Ausführungsform eine RNA, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

- a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder
- b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.

Bevorzugte, genetisch veränderte Pflanze sind ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassiceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae.

Besonders bevorzugte, genetisch veränderte Pflanzen sind ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes, Acacia, Aconitum, Adonis, Arnica, Aquilegia, Aster, Astragalus, Bignonia, Calendula, Caltha, Campanula, Canna, Centaurea, Cheiranthus, Chrysanthemum, Citrus, Crepis, Crocus, Cucurbita, Cytisus, Delo-

nia, Delphinium, Dianthus, Dimorphoteka, Doronicum, Escholtzia, Forsythia, Fremontia, Gazania, Gelsemium, Genista, Gentiana, Geranium, Gerbera, Geum, Grevilla, Helenium, Helianthus, Hepatica, Heracleum, Hisbiscus, Heliopsis, Hypericum, Hypochoeris, 5 Impatiens, Iris, Jacaranda, Kerria, Laburnum, Lathyrus, Leonardodon, Lilium, Linum, Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Marattia, Medicago, Mimulus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinap- 10 sis, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder Zinnia.

Ganz besonders bevorzugte, genetisch veränderte Pflanze sind ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes erecta oder 15 Tagetes patula.

Die transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile, insbesondere deren Blütenblätter sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

20

Die genetisch veränderten Pflanzen können, wie vorstehend beschrieben, zur Herstellung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten, insbesondere zur Herstellung von Lycopin,  $\beta$ -Carotin, Astaxanthin, Canthaxanthin, 25 Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin oder Adonixanthin und insbesondere zur Herstellung von Astaxanthin verwendet werden.

Die erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen weisen 30 im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Gehalt mindestens eines Carotinoids auf, ausgewählt aus der Gruppe Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten.

Unter einem erhöhten Gehalt wird in diesem Fall auch ein verringerter 35 sacher Gehalt an Ketocarotinoiden, bzw. Astaxanthin verstanden.

Von Menschen und Tieren verzehrbare erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten können 40 auch beispielsweise direkt oder nach an sich bekannter Prozessierung als Nahrungsmittel oder Futtermittel oder als Futter- und Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden. Ferner können die genetisch veränderten Pflanzen zur Herstellung von Carotinoidhaltigen Extrakten der Pflanzen und/oder zur Herstellung von Futter- 45 ter- und Nahrungsergänzungsmitteln verwendet werden.

Die genetisch veränderten Pflanzen können auch als Zierpflanzen im Horticulture-Bereich verwendet werden.

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, 5 ist aber nicht auf diese beschränkt:

Allgemeine Experimentelle Bedingungen:  
Sequenzanalyse rekombinanter DNA

10 Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).

15 Beispiel 1: Herstellung eines Klonierungsvektors zur Herstellung von doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz-Expressionskassetten für die blütenspezifischen Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta*

20

Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus Fragmenten der Epsilon-Cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 25 9298-10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711-1721)

Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils ein Fragment in korrekter Orientierung (Sense-Fragment) und ein sequenzidentisches Fragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Frag- 30 ment), die durch ein funktionelles Intron, das PIV2 Intron des ST-LH1 Genes aus Kartoffel (Vancanneyt G. et al. (1990) Mol Gen Genet 220: 245-50) mit einander verbunden sind.

Die cDNA, die für den AP3 Promoter (-902 bis +15) aus *Arabidopsis* 35 *thaliana* kodiert, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethode aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) und der Primer PR7 (SEQ ID No. 15) und PR10 (SEQ ID No. 18) hergestellt.

40 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) kodiert, erfolgte in einem 50  $\mu$ l Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

45

## 24

- 1 µl genomischer DNA aus *A. thaliana* (1:100 verd hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR7 (SEQ ID No. 15)
- 5 - 0,2 mM PR10 (SEQ ID No. 18)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0,25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28,8 µl Aq. Dest.

10 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
		50°C	1 Minute
15		72°C	1 Minute
	1X	72°C	10 Minuten

Das 922 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pTAP3 erhalten. Sequenzierung des Klon pTAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298-10200) unterscheidet (Position 33: T statt G, Position 55: T statt G). Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanze.

30 Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pTAP3 hergestellt. Die Region 10200-9771 wurde mit den Primern PR7 (SEQ ID No. 15) und Primern PR9 (SEQ ID No. 17) amplifiziert (Amplifikat A7/9), die 35 Region 9526-9285 wurde mit den PR8 (SEQ ID No. 16) und PR10 (SEQ ID No. 18) amplifiziert (Amplifikat A8/10).

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

40 Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die für die Regionen Region 10200-9771 und 9526-9285 des AP3 Promoters kodieren, erfolgte in 50 µl Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

## 25

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR7 (SEQ ID No. 15) bzw. PR8 (SEQ ID No. 16)
- 0,2 mM PR9 (SEQ ID No. 17) bzw. PR10 (SEQ ID No. 18)
- 5 - 5 µl 10 X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0,25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28,8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

10

- |      |      |           |
|------|------|-----------|
| 1 X  | 94°C | 2 Minuten |
| 35 X | 94°C | 1 Minute  |
|      | 50°C | 2 Minuten |
|      | 72°C | 3 Minuten |

15

- |     |      |            |
|-----|------|------------|
| 1 X | 72°C | 10 Minuten |
|-----|------|------------|

Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A7/9 und A8/10, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670-9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) beider Amplifikate A7/9 und A8/10 erfolgte in einem 17,6 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

25

- 0,5 µg A7/9
- 0,25 µg A8/10

30 Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 17,6 µl A7/9 und A8/10-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 35 - 50 µM dNTPs
- 2 µl 1 X Klenow Puffer
- 2 U Klenow Enzym

Die Nukleinsäure kodierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR7 SEQ ID No. 15) und eines antisense spezifischen Primers (PR10 SEQ ID No. 18) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

45

## 26

Die PCR zur Amplifikation des AP3P-Fragmentes erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 5 - 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR7 (SEQ ID No. 15)
- 0,2 mM PR10 (SEQ ID No. 18)
- 5 µl 10 X PCR-Puffer (Stratagene)
- 10 - 0,25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28,8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- |    |      |      |            |
|----|------|------|------------|
| 15 | 1 X  | 94°C | 2 Minuten  |
|    | 35 X | 94°C | 1 Minute   |
|    |      | 50°C | 1 Minuten  |
|    |      | 72°C | 1 Minuten  |
|    | 1 X  | 72°C | 10 Minuten |

20

Die PCR-Amplifikation mit PR7, SEQ ID No. 15 und PR10 SEQ ID No. 18 resultierte in einem 778 Bp Fragment das für die modifizierte Promoterversion AP3P kodiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200-9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285-9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

30

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pTAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heißt pJAP3P.

35

Ein DNA-Fragment, das das PIV2 Intron des Gens ST-LS1 enthält wurde mittels PCR unter Verwendung von Plasmid-DNA p35SGUS INT (Vancanneyt G. et al. (1990) Mol Gen Genet 220: 245-50) sowie der Primer PR40 (Seq ID No. 20) und Primer PR41 (Seq ID No. 21) her-

40 gestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der Sequenz des Intron PIV2 des Gens ST-LS1, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl p35SGUS INT
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 µM PR40 (SEQ ID No. 20)
- 0,2 µM PR41 (SEQ ID No. 21)
- 5 - 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- |    |     |      |            |
|----|-----|------|------------|
| 10 | 1X  | 94°C | 2 Minuten  |
|    | 35X | 94°C | 1 Minute   |
|    |     | 53°C | 1 Minute   |
|    |     | 72°C | 1 Minute   |
| 15 | 1X  | 72°C | 10 Minuten |

Die PCR-Amplifikation mit PR40 und PR41 resultierte in einem 206 Bp-Fragment. Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pBluntII (Invitrogen) kloniert und der Klon pBluntII-40-41 erhalten. Sequenzierungen dieses Klon mit dem Primer SP6 bestätigte eine Sequenz, die identisch ist mit der entsprechenden Sequenz aus dem Vektor p35SGUS INT.

25 Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Vektor pJAP3P (oben beschrieben).

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 206 Bp SalI-BamHI Fragmentes aus pBluntII-40-41 und Ligierung mit dem SalI-BamHI geschnittenen Vektor pJAP3P. Der Klon, der das Intron PIV2 des Gens ST-LS1 in der korrekten Orientierung anschließend an das 3'Ende des rbcS Transitpeptides enthält, heißt pJAI1 und ist geeignet, Expressionskassetten für die blütenspezifische Expression von Inverted-Repeat Transkripten herzustellen.

35 In der Abbildung 2 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment intron das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Beispiel 2: Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die 5'Region der Epsilon-Cyclase cDNA)

5

Die Nukleinsäure, die die 5'terminale 435bp Region der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank accession no. AF251016) enthält, wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta* cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR42 SEQ ID No. 22) und eines antisense spezifischen Primers (PR43 SEQ ID No. 23) amplifiziert. Die 5'terminale 435 bp Region der Epsilon-Cyclase cDNA aus *Tagetes erecta* setzt sich zusammen aus 138 bp 5'Nicht-translatierter Sequenz (5'UTR) und 297 bp der dem N-Terminus entsprechenden kodierenden Region.

15

Für die Präparation von Total-RNA aus Blüten von *Tagetes* wurden 100mg der gefrorenen, pulverisierten Blüten in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0,8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 0,2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12000 g wurde der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Für die cDNA-Synthese wurden 2,5 µg Gesamt-RNA für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers (PR17 SEQ ID No. 19) in cDNA umgeschrieben.

Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR42-PR43 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 435bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

40

-	1	µl	cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
-	0,25	mM	dNTPs
-	0,2	µM	PR42 (SEQ ID No. 22)
-	0,2	µM	PR43 (SEQ ID No. 23)
45 -	5	µl	10X PCR-Puffer (TAKARA)
-	0,25	µl	R Taq Polymerase (TAKARA)
-	28,8	µl	Aq. Dest.



## 29

Die PCR zur Amplifikation des PR44-PR45 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 435 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 5 - 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 µM PR44 (SEQ ID No. 24)
- 0,2 µM PR45 (SEQ ID No. 25)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 10 - 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 µl Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- |    |     |      |            |
|----|-----|------|------------|
| 15 | 1X  | 94°C | 2 Minuten  |
|    | 35X | 94°C | 1 Minute   |
|    |     | 58°C | 1 Minute   |
|    |     | 72°C | 1 Minute   |
| 20 | 1X  | 72°C | 10 Minuten |

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR42 und PR43 resultierte in einem 443 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR44 und PR45 resultierte in einem 444 Bp-Fragment.

25

Die beiden Amplifikate, das PR42-PR43 (HindIII-SalI sense) Fragment und das PR44-PR45 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit

- 30 dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine zur publizierten Sequenz AF251016 (SEQ ID No. 4) identische Sequenz abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen. Diese Klon wurde daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel 1) verwendet.

35

Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 444 Bp PR44-PR45 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, der 5'terminale Region

- 40 der Epsilon-Cyclase in der antisense Orientierung enthält, heißt pJAI2. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem antisense Fragment der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV.

- 45 Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 443 Bp PR42-PR43 HindIII-SalI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-SalI ge-

schnittenen Vektor pJAI2. Der Klon, der 435 bp 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase cDNA in der sense Orientierung enthält, heißt pJAI3. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem AP3P und dem sense Fragment der 5'terminale Region  
5 der Epsilon-Cyclase.

Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wurde ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer DNA aus Petunie (nach Standard-  
10 methoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC5 (SEQ ID No. 42) und PRCHRC3 (SEQ ID No. 43) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klons pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz.  
15 Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJAI3 verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 bp SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJAI3. Der Klon, der den Promoter CHRC anstelle des ursprünglichen Promoters AP3P enthält, heißt pJCI3.  
20

Die Herstellung der Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P- bzw. CHRC-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter  
25 der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI3 wurde das 2622 bp SacI-XhoI Fragment aus pJAI3 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 3, Konstruktkarte).  
30

In der Abbildung 3 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment 5sense die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment  
35 5anti die 5'Region der Epsilon-cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in antisense Orientierung, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CI3 wurde das 3394 bp SacI-XhoI Fragment aus pJCI3 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 4, Konstruktkarte).  
40

In der Abbildung 4 beinhaltet Fragment CHRC den Promoter (1537 bp), Fragment 5sense die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus  
45 *Tagetes erecta* (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment intron das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment 5anti die

5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Antisense-Orientierung, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

5 Beispiel 3: Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die 3'Region der Epsilon-Cyclase cDNA)

10 Die Nukleinsäure, die die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank accession no. AF251016) enthält wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta* cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR46 SEQ ID No. 26) und eines antisense spezifischen Primers (PR47  
15 SEQ ID No. 27) amplifiziert. Die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA aus *Tagetes erecta* setzt sich zusammen aus 140 bp 3'-Nicht-translatierter Sequenz (3'UTR) und 244 bp der dem C-Terminus entsprechenden kodierenden Region.

20 Die Präparation von Total-RNA aus Blüten von *Tagetes* erfolgte wie unter Beispiel 2 beschrieben.

Die cDNA Synthese erfolgte wie unter Beispiel 1 unter Verwendung des antisense spezifischen Primers PR17 (SEQ ID No. 19)

25 beschrieben.

Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die folgenden:

30 Die PCR zur Amplifikation des PR46-PR457 DNA-Fragmentes, das die 3'terminale 384 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

-	1	µl	cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
35 -	0,25	mM	dNTPs
-	0,2	µM	PR46 (SEQ ID No. 26)
-	0,2	µM	PR47 (SEQ ID No. 27)
-	5	µl	10X PCR-Puffer (TAKARA)
-	0 25	µl	R Taq Polymerase (TAKARA)
40 -	28,8	µl	Aq. Dest.

Die PCR zur Amplifikation des PR48-PR49 DNA-Fragmentes, das die 3'terminale 384 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

## 32

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 µM PR48 (SEQ ID No. 28)
- 0,2 µM PR49 (SEQ ID No. 29)
- 5 - 5 µl 10 X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 µl Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen  
10 durchgeführt:

	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
		58°C	1 Minute
15		72°C	1 Minute
	1X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 26 und SEQ ID No. 27 resul-  
tierte in einem 392 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit SEQ ID  
20 No. 28 und SEQ ID No. 29 resultierte in einem 396 Bp-Fragment.

Die beiden Amplifikate, das PR46-PR47 Fragment und das PR48-PR49  
Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den  
PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequen-  
25 zierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine zur publi-  
zierten Sequenz AF251016 (SEQ ID No. 4) identische Sequenz abge-  
sehen von den eingeführten Restriktionsstellen. Diese Klone wurde  
daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem  
Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel 1) verwendet.

30

Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des  
396 Bp PR48-PR49 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvek-  
tor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI  
geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, der 3'terminale Region  
35 der Epsilon-Cyclase in der antisense Orientierung enthält,  
heißt pJAI4. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle  
Fusion zwischen dem Antisense-Fragment der 3'terminale Region  
der Epsilon-Cyclase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV.

40 Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des  
392 Bp PR46-PR47 HindIII-SalI Fragmentes aus dem Klonierungsvek-  
tor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-SalI  
geschnittenen Vektor pJAI4. Der Klon, der 392 bp 3'terminale Re-  
gion der Epsilon-Cyclase cDNA in der sense Orientierung enthält,  
45 heißt pJAI5. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle

Fusion zwischen dem AP3P und dem Sense-Fragmente 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase.

Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-  
5 vermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900). Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI5 wurde das 2523 bp SacI-XhoI Fragment aus pJAI5 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert  
10 (Abbildung 5, Konstruktkarte).

In der Abbildung 5 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment sense die 3'region der Epsilon cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in sense Orientierung, Frag-  
15 ment intron das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment anti die 3'region der Epsilon cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in antisense Orientierung, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

#### 20 Beispiel 4: Klonierung des Epsilon-Cyclase Promoters

Ein 199 bp Fragment bzw. das 312 bp Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters wurde durch zwei unabhängige Klonierungsstrategien, Inverse PCR (adaptiert Long et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 90:  
25 10370) und TAIL-PCR (Liu Y-G. et al. (1995) Plant J. 8: 457-463) unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethode aus *Tagetes erecta*, Linie Orangenprinz, isoliert) isoliert.

Für den Inverse PCR-Ansatz wurden 2 µg genomische DNA in einem  
30 25 µl Reaktionsansatz mit EcoRV und RsaI verdaut, anschließend auf 300 µl verdünnt und über Nacht bei 16°C mit 3U Ligase religiert. Unter Verwendung der Primer PR50 (SEQ ID No. 30) und PR51 (SEQ ID No. 31) wurde durch PCR Amplifikation ein Fragment hergestellt, das, jeweils in Sense-Orientierung, 354 bp der Epsilon-  
35 Cyclase cDNA (Genbank Accession AF251016), ligiert an 300 bp des Epsilon-Cyclase Promoters sowie 70 bp des 5'terminalen Bereichs der cDNA Epsilon-Cyclase enthält (siehe Abbildung 6).

Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:

40

Die PCR zur Amplifikation des PR50-PR51 DNA-Fragmentes, das unter anderem das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

45

## 34

- 1 µl Ligationsansatz (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 µM PR50 (SEQ ID No. 30)
- 0,2 µM PR51 (SEQ ID No. 31)
- 5 - 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 µl Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen  
10 durchgeführt:

	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
		53°C	1 Minute
15		72°C	1 Minute
	1X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR50 und PR51 resultierte in  
einem 734 Bp-Fragment, das unter anderem das 312 bp Promoterfrag-  
20 ment der Epsilon-Cyclase enthält (Abbildung 6).

Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in  
den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequen-  
zierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz SEQ ID  
25 No. 11. Diese Sequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikations-  
experiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotid-  
sequenz in der verwendeten *Tagetes erecta* Linie Orangenprinz.

Für den TAIL-PCR Ansatz wurden drei sukzessive PCR-Reaktionen  
30 mit jeweils unterschiedlichen gen-spezifischen Primern (nested  
primers) durchgeführt.

Die TAIL1-PCR erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem ent-  
halten war:

- 35
- 1 ng genomische DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
  - 0,2 mM jedes dNTPs
  - 0,2 µM PR60 (SEQ ID No. 32)
  - 0,2 µM AD1 (SEQ ID No. 35)
  - 40 - 2 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
  - 0,5 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
  - mit Aq. Dest. auf 20 µl aufgefüllt

AD1 stellte dabei zunächst eine Mischung aus Primern der Sequen-  
45 zen (a/c/g/t)tcga(g/c)t(a/t)t(g/c)g(a/t)gtt dar.

Die PCR-Reaktion TAIL1 wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 1X 93°C: 1 Min., 95°C: 1 Min.  
 5 5X 94°C: 30 Sek., 62°C: 1 Min., 72°C: 2,5 Min.  
 1X 94°C: 30 Sek., 25°C: 3 Min., ramp to 72°C in 3 Min.  
 72°C: 2,5 Min  
 15X 94°C: 10 Sek., 68°C: 1 Min., 72°C: 2,5 Min.;  
 94°C: 10 Sek., 68°C: 1 Min., 72°C: 2,5 Min.;  
 10 94°C: 10 Sek., 29°C: 1 Min., 72°C: 2,5 Min.  
 1X 72°C: 5 Min.

Die TAIL2-PCR erfolgte in einem 21 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 15 - 1 µl einer 1:50 Verdünnung des TAIL1-Reaktionsansatzes  
 (hergestellt wie oben beschrieben)  
 - 0,8 mM dNTP  
 - 0,2 µM PR61 (SEQ ID No. 33)  
 20 - 0,2 µM AD1 (SEQ ID No. 35)  
 - 2 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)  
 - 0,5 µl R Taq Polymerase (TAKARA)  
 - mit Aq. Dest. auf 21 ul aufgefüllt

25 Die PCR-Reaktion TAIL2 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 12X 94°C: 10 Sekunden, 64°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten;  
 94°C: 10 Sekunden, 64°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten;  
 30 94°C: 10 Sekunden, 29°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten  
 1X 72°C: 5 Minuten

Die TAIL3-PCR erfolgte in einem 100 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 35 - 1 µl einer 1:10 Verdünnung des TAIL2-Reaktionsansatzes  
 (hergestellt wie oben beschrieben)  
 - 0,8 mM dNTP  
 - 0,2 µM PR63 (SEQ ID No. 34)  
 40 - 0,2 µM AD1 (SEQ ID No. 35)  
 - 10 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)  
 - 0,5 µl R Taq Polymerase (TAKARA)  
 - mit Aq. Dest. auf 100 ul aufgefüllt

45 Die PCR-Reaktion TAIL3 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt;

20X 94°C: 15 Sekunden, 29°C: 30 Sekunden, 72°C: 2 Minuten  
 1X 72°C: 5 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR63 und AD1 resultierte in  
 5 einem 280 Bp-Fragment, das unter anderem das 199 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält (Abbildung 7).

Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in  
 den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequen-  
 10 zierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz SEQ ID  
 No. 12. Diese Sequenz ist identisch mit der ecyclase Region innerhalb  
 der Sequenz SEQ ID No. 11, die mit der IPCR Strategie isoliert wurde,  
 und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten  
*Tagetes erecta* Linie Orangenprinz.

15 Der pCR2.1-Klon, der das 312 bp Fragment (SEQ ID No. 11) des  
 Epsilon-Cyclase Promoters, das durch die IPCR-Strategie isoliert  
 wurde, enthält, heißt pTA-ecycP und wurde für die Herstellung der  
 IR Konstrukte verwendet.

20 Beispiel 5: Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette  
 für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase  
 dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die Promoterregion der  
 Epsilon-Cyclase cDNA).

25 Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus  
 Promoterfragmenten der Epsilon-cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte  
 unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen  
 Promoters AP3 aus *Arabidopsis* (siehe Beispiel 1) oder des  
 30 blütenspezifischen Promoters CHRC (Genbank accession  
 no. AF099501). Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils  
 ein Epsilon-Cyclase-Promoterfragment in korrekter Orientierung  
 (Sense-Fragment) und ein sequenzidentisches Epsilon-Cyclase-Pro-  
 moterfragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Frag-  
 35 ment), die durch ein funktionelles Intron (siehe Beispiel 1) miteinander  
 verbunden sind.

Die Promoterfragmente wurde mittels PCR unter Verwendung von  
 Plasmid-DNA (Klon pTA-ecycP, siehe Beispiel 4) und der Primer  
 40 PR124 (SEQ ID No. 36) und PR126 (SEQ ID No. 38) bzw. der Primer  
 PR125 (SEQ ID No. 37) und PR127 (SEQ ID No. 39) hergestellt.

Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:



## 37

Die PCR zur Amplifikation des PR124-PR126 DNA-Fragmentes, das das Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 5 - 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 µM PR124 (SEQ ID No. 36)
- 0,2 µM PR126 (SEQ ID No. 38)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 10 - 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 µl Aq. Dest.

Die PCR zur Amplifikation des PR125-PR127 DNA-Fragmentes, das das 312bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 µM PR125 (SEQ ID No. 37)
- 20 - 0,2 µM PR127 (SEQ ID No. 39)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 µl Aq. Dest.

25 Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

30	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
		53°C	1 Minute
		72°C	1 Minute
	1X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR124 und PR126 resultierte in einem 358 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR125 und PR127 resultierte in einem 361 Bp-Fragment.

Die beiden Amplifikate, das PR124-PR126 (HindIII-SalI sense) Fragment und das PR125-PR127 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine Sequenz, die abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen identisch ist zu SEQ ID No. 11. Diese Klone wurden daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel 1) verwendet.

Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 358 Bp PR124-PR126 HindIII-SalI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, das Epsilon-Cyclase Promoterfragment in der sense Orientierung enthält, heißt cs43. Durch die Ligation wird das Sense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters zwischen den AP3P Promoter und das Intron eingefügt.

Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 361Bp PR125-PR127 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor cs43. Der Klon, der das Epsilon-Cyclase Promoterfragment in der antisense Orientierung enthält, heißt cs44. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Intron und dem Antisense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters.

Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wurde ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer DNA aus Petunie (nach Standardmethoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC3' (SEQ ID NO. 43) und PRCHRC5' (SEQ ID NO. 42) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klons pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor cs44 verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 bp SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor cs44. Der Klon, der den Promoter CHRC anstelle des ursprünglichen Promoters AP3P enthält, heißt cs45.

Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle zweier Promotoren, des CHRC-Promoter und des AP3P-Promoters, wurde der AP3P-Promoter in antisense Orientierung an den 3' Terminus des Epsilon-Cyclase antisense Fragmentes in cs45 kloniert. Das AP3P-Promoterfragments aus pJAI1 wurde unter Verwendung der Primer PR128 und PR129 amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Die Sequenzierung mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID No. 1 identische Sequenz.. Dieser Klon pCR2.1-AP3PSX wurde für Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle zweier Promotoren verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 bp SalI-XhoI Fragments aus pCR2.1-AP3PSX und Ligierung in den XhoI geschnittenen Vektor cs45. Der Klon, der 3'seitig des Inverted Repeats, den Promoter AP3P in antisense Orientierung enthält, heißt cs46.

5

Die Herstellung der Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

10

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI7 wurde das 1685bp SacI-XhoI Fragment aus cs44 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 8, Konstruktkarte).

15 In der Abbildung 8 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), und Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in antisense  
20 Orientierung.

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CI7 wurde das 2445bp SacI-XhoI Fragment aus cs45 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 9, Konstruktkarte).

25

In der Abbildung 9 beinhaltet Fragment *CHRC* den *CHRC*-Promoter (1537 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), und Fragment *P-anti* das 312 bp  
30 Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in antisense Orientierung.

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CI7 wurde das 3219bp SacI-XhoI Fragment aus cs46 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 10, Konstruktkarte)

35

In der Abbildung 10 beinhaltet Fragment *CHRC* den *CHRC*-Promoter (1537 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), Fragment *P-anti* das 312 bp  
40 Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in antisense Orientierung und das Fragment AP3P das 771 bp AP3P-Promoterfragment in antisense Orientierung.

## Beispiel 6: Herstellung transgener Tagetes Pflanzen

Tagetessamen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, *Physiol. Plant.* 15(1962), 473-497) pH 5,8, 2 % Saccharose) aufgelegt. Die Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18 bis 28°C/20 bis 200  $\mu$ E/3 bis 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21°C, 20 bis 70  $\mu$ E, für 4 bis 8 Wochen.

10 Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten in vitro Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 bis 60 mm<sup>2</sup> werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS-Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

15 Der Agrobakterium tumefaciens Stamm EHA105 wurde mit dem Binärplasmid PS5AI3 transformiert. Die Anzucht des transformierten A. tumefaciens Stammes EHA105 erfolgte über Nacht unter folgenden Bedingungen: Eine Einzelkolonie wurde in YEB (0,1 % Hefeextrakt, 20 0,5 % Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat x 7 H<sub>2</sub>O) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28°C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wurde die Bakterien-suspension durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min geerntet und derart in flüssigem MS Medium resuspendiert, dass eine OD<sub>600</sub> 25 von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension wurde für die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.

Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakterien-suspension 30 ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakterien-suspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylamino- 35 purin (BAP) sowie 1 mg/l Indolylessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 bis 80  $\mu$ Mol/m<sup>2</sup> x sec, Temperatur: 40 22 bis 24°C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzen- 45 tration von 200 bis 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer

41

Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.

- 5 Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sprossknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure
- 10 (IBA) und 0,5 mg/l Gibberillinsäure  $GA_3$ , zur Bewurzelung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.

Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:

- Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 bis 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert werden.
- 20 - Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.
- Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.
- 25 - Die Zugabe von  $AgNO_3$  (3 bis 10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.
- 30 - Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.
- 35 - Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.

- 40 Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien erhalten:

Mit pS5AI3 wurde erhalten: CS30-1, CS30-3 und CS30-4

## Beispiel 7: Charakterisierung der transgenen Pflanzen

Das Blütenmaterial der transgenen *Tagetes erecta* Pflanzen aus Beispiel 6 wurde in flüssigem Stickstoff gemörserst und das Pulver (etwa 250 bis 500 mg) mit 100 % Aceton extrahiert (dreimal je 500  $\mu$ l). Das Lösungsmittel wurde evaporiert und die Carotinoide in 100  $\mu$ l Aceton resuspendiert.

Mittels einer C30-reverse phase-Säule konnte zwischen Mono- und Diestern der Carotinoide unterschieden werden. HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al. (2000), Plant Journal 24(4): 551-558). Eine Identifizierung der Carotinoide war aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich.

Tabelle 1 zeigt das Carotinoidprofil in *Tagetes* petalen der gemäß der vorstehend beschriebenen Beispiele hergestellten transgenen *Tagetes*- und Kontroll*tagetes*pflanzen. Alle Carotinoidmengen sind in [ $\mu$ g/g] Frischgewicht angegeben, prozentuale Veränderungen gegenüber der Kontrollpflanze sind in Klammern angegeben.

Im Vergleich zur genetisch nicht veränderten Kontrollpflanze, weisen die genetisch veränderten Pflanzen einen deutlich erhöhten Gehalt an Carotinoiden des " $\beta$ -Carotin-Weges", wie beispielsweise  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin und einen deutlich reduzierten Gehalt an Carotinoiden des " $\alpha$ -Carotin-Weges", wie beispielsweise Lutein auf.

Tabelle 1

30

35

Pflanze	Lutein	$\beta$ -Carotin	Zeaxanthin	Violaxanthin	Gesamt-Carotinoide
Kontrolle	260	4,8	2,7	36	304
CS 30-1	35 (-86%)	13 (+170%)	4,4 (+62%)	59 (+63%)	111 (-63%)
Kontrolle	456	6,4	6,9	58	527
CS 30-3	62 (-86%)	13 (+103%)	8,9 (+29%)	75 (+29%)	159 (-70%)
CS 30-4	68 (-85%)	9,1 (+42%)	5,7 (-17%)	61 (+5%)	144 (-73%)
Kontrolle	280	4,1	2,6	42	329
CS 32-9	69 (-75%)	5,5 (+34%)	2,3 (-12%)	25 (-38%)	102 (-69%)

40

Vergleichsbeispiel 1: Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in *Tagetes erecta* durch Antisense

Unter Verwendung herkömmlicher, dem Fachmann bekannter Methoden wurde als Vergleichsbeispiel eine *Tagetes erecta* Antisense-Linie CS32-9 hergestellt bei der die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität

45

durch Antisense erfolgte. Das Carotinoidprofil dieser Linie (CS32-9), gemessen nach vorstehend beschriebener Methode ist ebenfalls in Tabelle 1 dargestellt.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Zeaxanthin und/oder dessen  
5 biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten durch Kultivierung von genetisch veränderten Pflanzen die im Vergleich zum Wildtyp eine, durch doppelsträngige  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenzen verursachte, reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man in die Pflanze eine RNA einbringt, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die  
15 a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder  
b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.  
20
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Bereich mit Doppel-Strang-Struktur eine Nukleinsäuresequenz enthält, die mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  
25  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder das 3'-Ende der Pflanze eigenen Nukleinsäure, kodierend eine  $\epsilon$ -Cyclase enthält.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Bereich mit Doppel-Strang-Struktur je-  
30 weils einen "sense"-RNA-Strang enthält, umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA- $\epsilon$ -Cyclase Transkriptes, und einen "antisense"-RNA-Strang enthält, der zu dem  
35 „sense“-RNA-Strang im wesentlichen komplementär ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blüten die geringste Expressionsrate einer  $\epsilon$ -Cyclase  
40 aufweisen.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Transkription der doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz unter Kontrolle eines blütenspezifischen  
45 Promotors erfolgt.



7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae,  
5 Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae verwendet.
- 10 8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes, Acacia, Aconitum, Adonis, Arnica, Aquilegia, Aster, Astragalus, Bignonia, Calendula, Caltha,  
15 Campanula, Canna, Centaurea, Cheiranthus, Chrysanthemum, Citrus, Crepis, Crocus, Curcubita, Cytisus, Delonia, Delphinium, Dianthus, Dimorphotheca, Doronicum, Eschscholtzia, Forsythia, Fremontia, Gazania, Gelsemium, Genista, Gentiana, Geranium, Gerbera, Geum, Grevilla, Helenium, Helianthus, Hepatica, Heracleum, Hibiscus, Heliopsis, Hypericum, Hypochoeris, Impatiens, Iris, Jacaranda, Kerria, Laburnum, Lathyrus, Leontodon, Lilium, Linum, Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Marattia, Medicago, Mimulus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla,  
20 Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapsis, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder Zinnia verwendet.
- 30 9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Pflanzenarten Marigold, Tagetes erecta oder Tagetes patula verwendet.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass man nach dem Kultivieren die genetisch veränderten Pflanzen erntet und anschließend Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukte aus den Pflanzen isoliert.  
35
- 40 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukte ausgewählt sind aus der Gruppe Lycopin,  $\beta$ -Carotin, Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin Adonixanthin, Antheraxanthin,  
45 Violaxanthin, Neoxanthin, Capsorubin, und Capsanthin.

12. Ribonukleinsäurekonstrukt, enthaltend RNA, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die
  - a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder
  - b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.
13. Nukleinsäurekonstrukt, transkribierbar in
  - a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA- $\epsilon$ -Cyclase Transkriptes, und
  - b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.
14. Nukleinsäurekonstrukt, umfassend
  - a) einen "sense"-DNA-Strang der im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des Promotorbereichs eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens, und
  - b) einen "antisense"-DNA-Strang, der zu dem DNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.
15. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 13, wobei die aus dem  $\epsilon$ -Cyclase-Transkript ableitbare cDNA-Sequenz durch SEQ. ID. NO. 4 beschrieben ist.
16. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 14, wobei die Nukleinsäuresequenz des Promotorbereichs des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens durch SEQ. ID. NO. 13 beschrieben ist.
17. Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 12 bis 16, wobei "sense"-RNA-Strang und "antisense"-RNA-Strang kovalent in Form eines invertierten Repeats miteinander verbunden sind.

18. Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 12 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäurekonstrukt zusätzlich funktionell verknüpft einen Promotor enthält.
- 5 19. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass man einen blütenspezifischen Promotor verwendet.
20. Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, dass man Expressionskassetten, enthaltend ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß einem der Ansprüche 12 bis 19, in eine Ausgangspflanze einführt.
- 10 21. Genetisch veränderte Pflanze, die im Vergleich zum Wildtyp eine, durch doppelsträngige  $\epsilon$ -Cyclase- Ribonukleinsäuresequenzen verursachte, reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.
- 15 22. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderte Pflanze eine RNA enthält, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die
- 20 a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder
- 25 b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.
- 30 23. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanze ausgewählt ist aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, 35 Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae.
- 40 24. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanze ausgewählt ist aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes, Acacia, Aconitum, Adonis, Arnica, Aquilegia, Aster, Astragalus, Bignonia, Calendula, Caltha, Campanula, Canna, Centaurea, Cheiranthus, 45 Chrysanthemum, Citrus, Crepis, Crocus, Curcubita, Cytisus, Delonia, Delphinium, Dianthus, Dimorphotoca, Doronicum, Escholtzia, Forsythia, Fremontia, Gazania, Gelsemium,

Genista, Gentiana, Geranium, Gerbera, Geum, Grevilla,  
Helenium, Helianthus, Hepatica, Heracleum, Hisbiscus,  
Heliopsis, Hypericum, Hypochoeris, Impatiens, Iris, Jaca-  
randa, Kerria, Laburnum, Lathyrus, Leontodon, Lilium, Linum,  
5 Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Maratia, Medicago, Mimulus,  
Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis,  
Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron,  
Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapsis, Sorbus,  
Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum,  
10 Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder Zinnia.

25. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 24, dadurch  
gekennzeichnet, dass die Pflanze ausgewählt ist aus den  
Pflanzenarten Marigold, Tagetes erecta oder Tagetes patula.

15

26. Verwendung der genetisch veränderten Pflanzen nach einem  
der Ansprüche 21 bis 25 als Zierpflanzen oder als Futter-  
und Nahrungsmittel.

20 27. Verwendung der genetisch veränderten Pflanzen nach einem der  
Ansprüche 21 bis 25 zur Herstellung von carotinoidhaltigen  
Extrakten oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungser-  
gänzungsmitteln.

25

30

35

40

45

Verfahren zur Herstellung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten durch Kultivierung von genetisch veränderten Pflanzen die im Vergleich zum Wildtyp eine durch doppelsträngige  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenzen verursachte reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen, die genetisch veränderten Pflanzen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von Carotinoidextrakten.

15

20

25

30

35

40

45

Abbildung 1: Schema der Carotinoidbiosynthese in *Tagetes erecta* Blüten

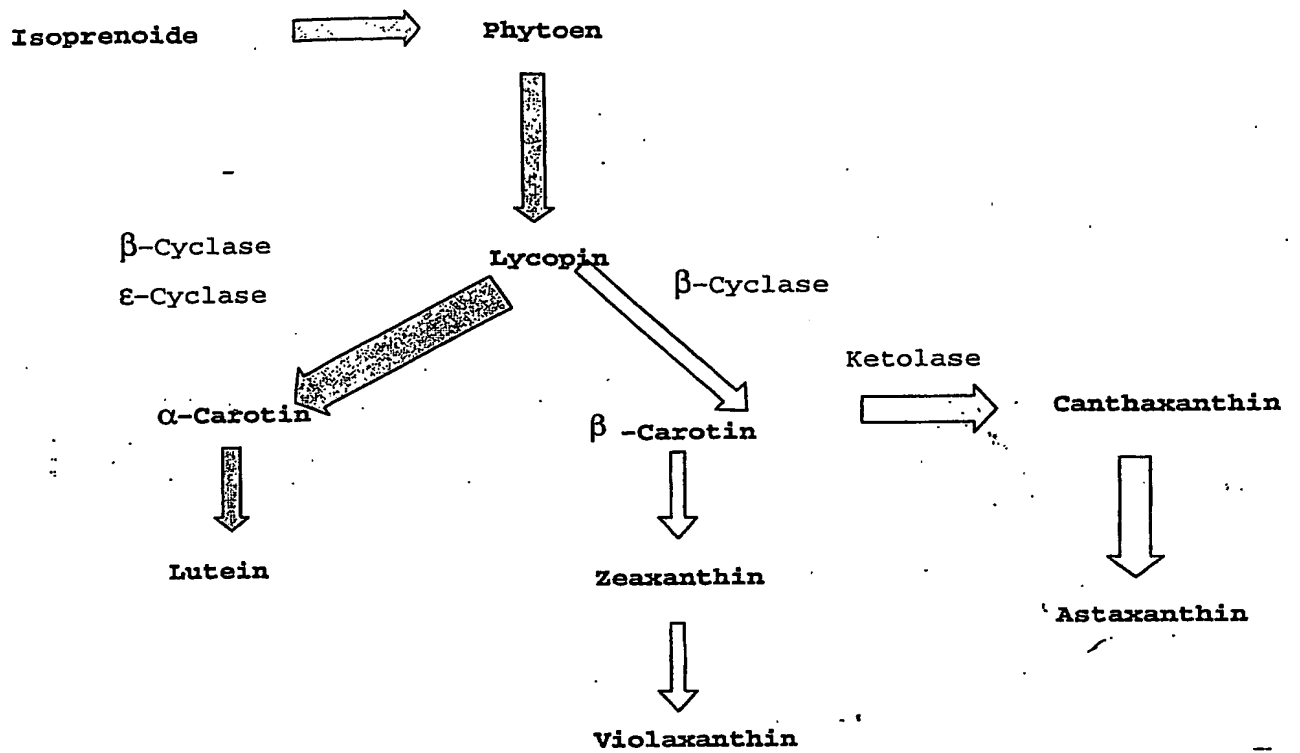
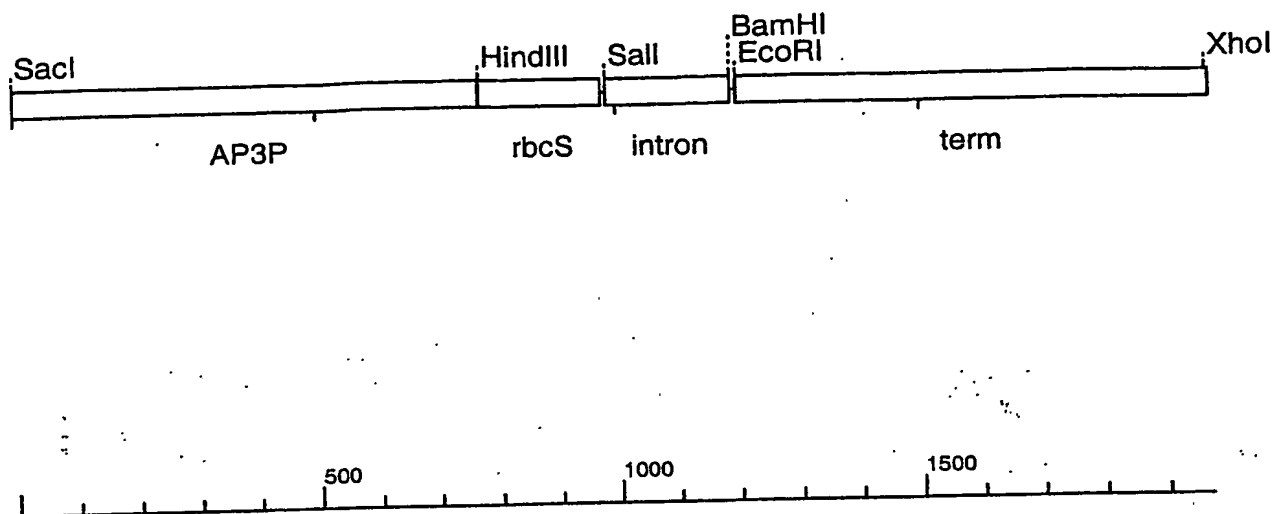


Abbildung 2: Klonierungskassette zur Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blütenspezifische Expression von Epsilon-Cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta*



**pJA11** (1966 bps)

Abbildung 3: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 5' terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters

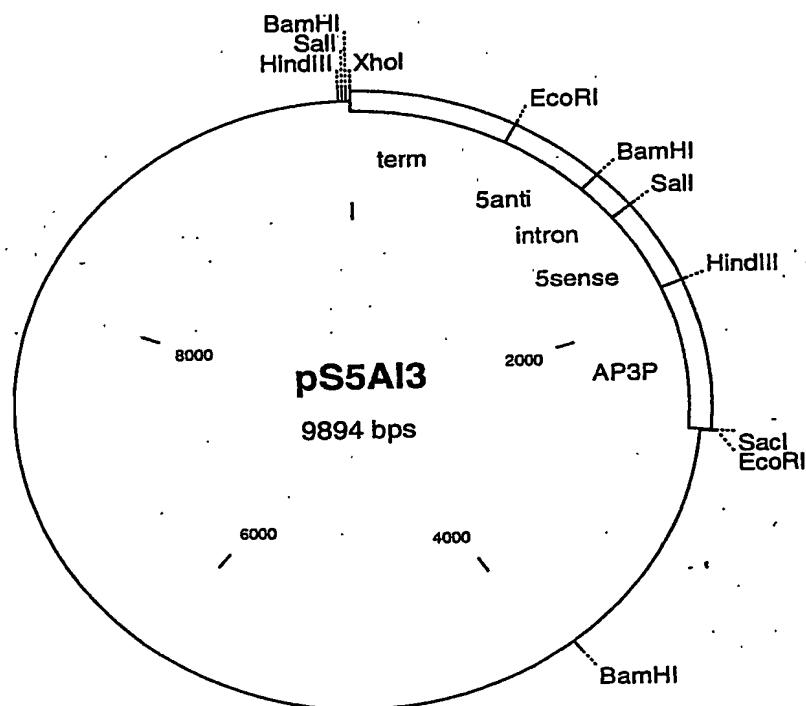




Abbildung 4: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 5'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des CHRC-Promoters

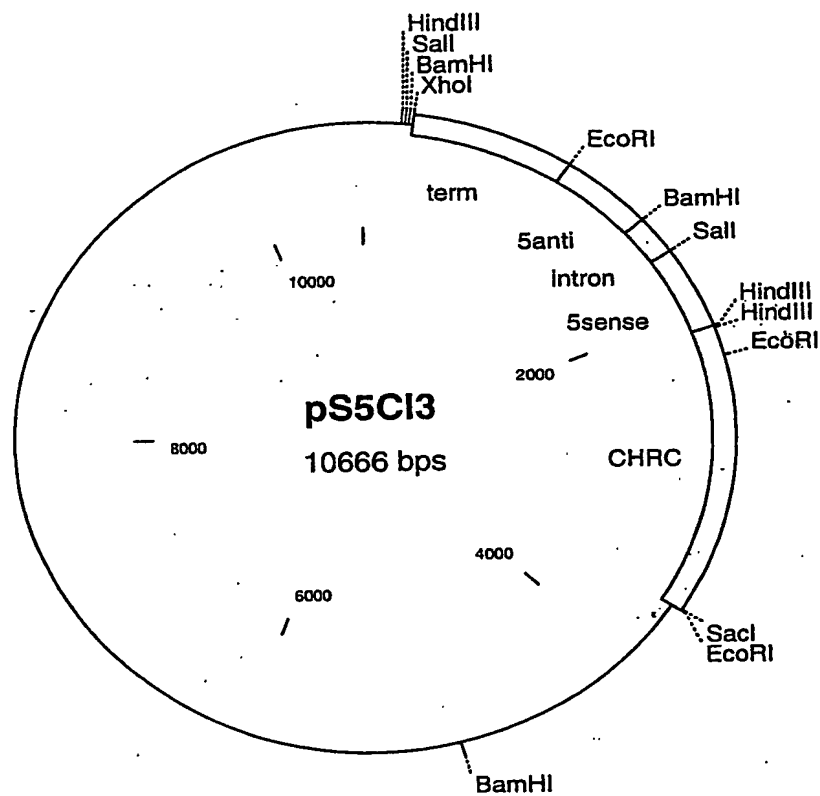


Abbildung 5: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 3'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters

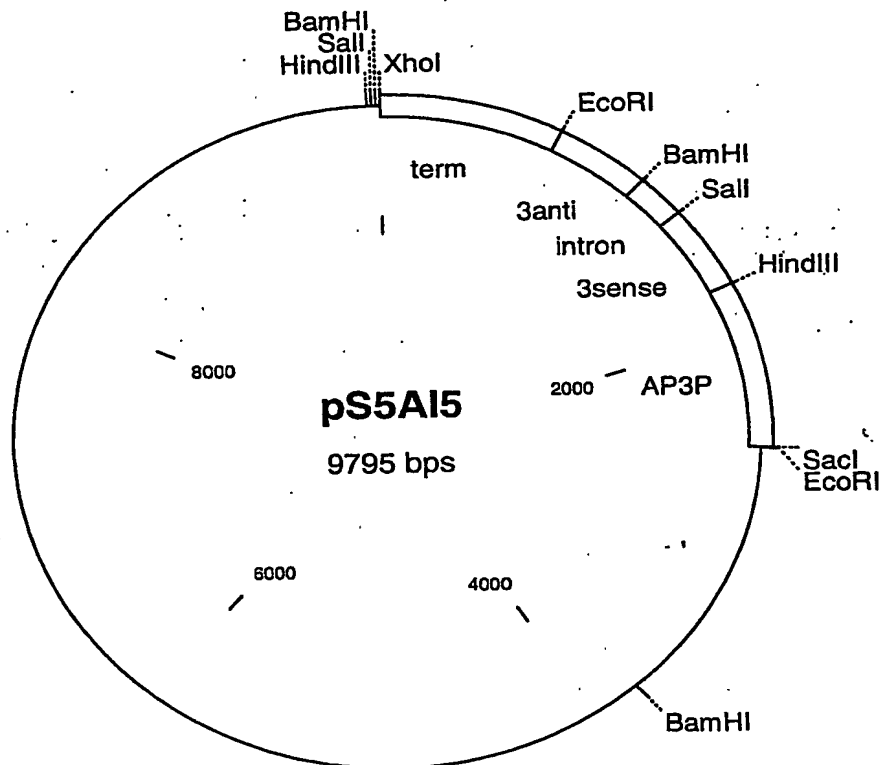


Abbildung 6: Inverse PCR-Amplifikation, das das 312 bp Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters enthält

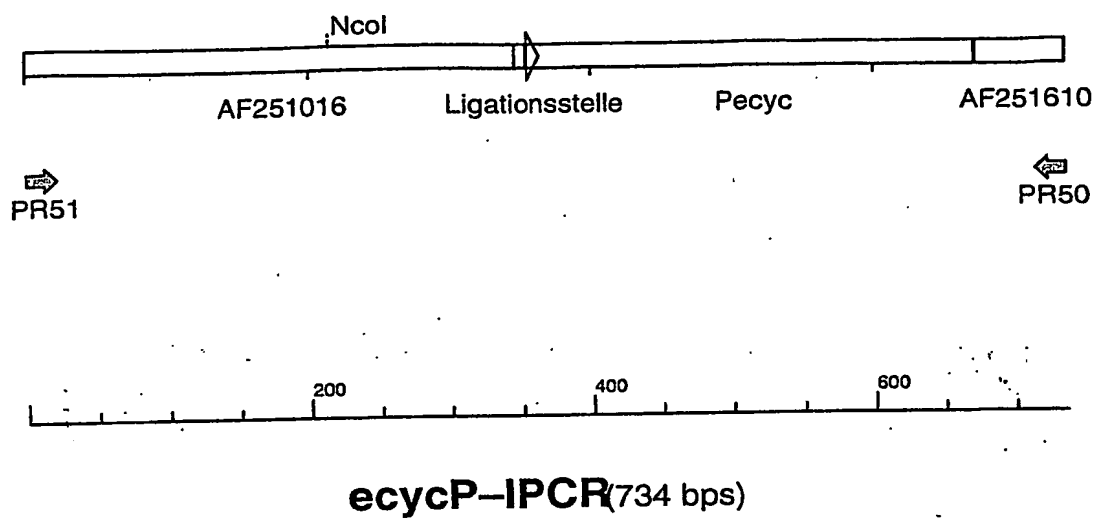


Abbildung 7: TAIL PCR-Amplifikat, das das 199 bp Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters enthält

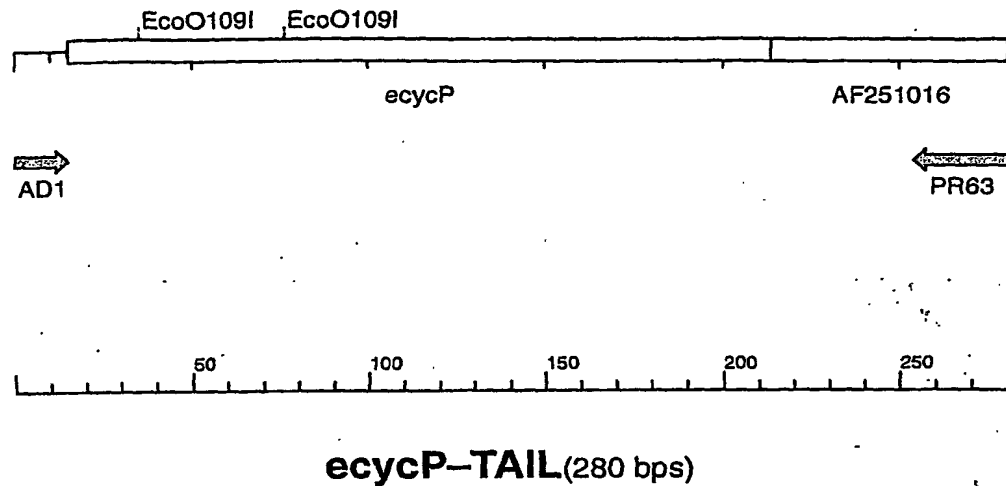


Abbildung 8: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp 5' Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle des AP3P-Promoters

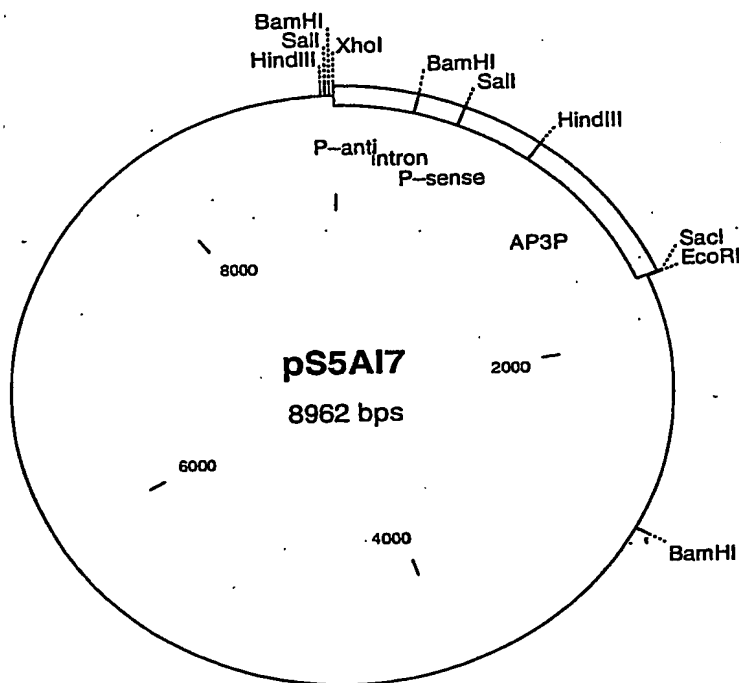


Abbildung 9: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle des CHRC-Promoters

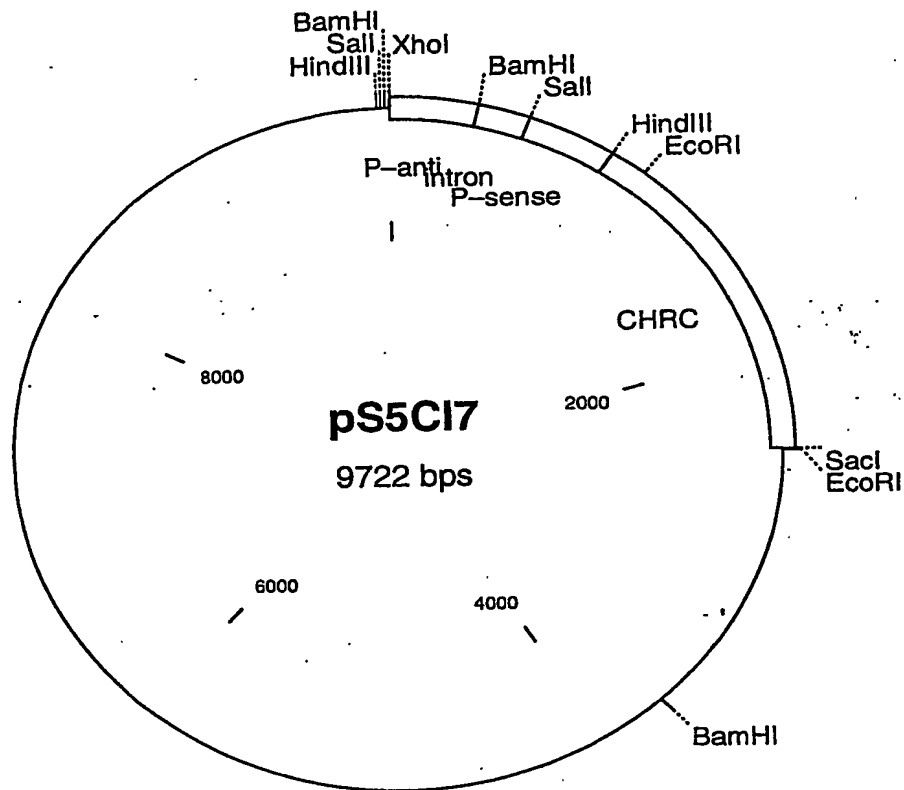
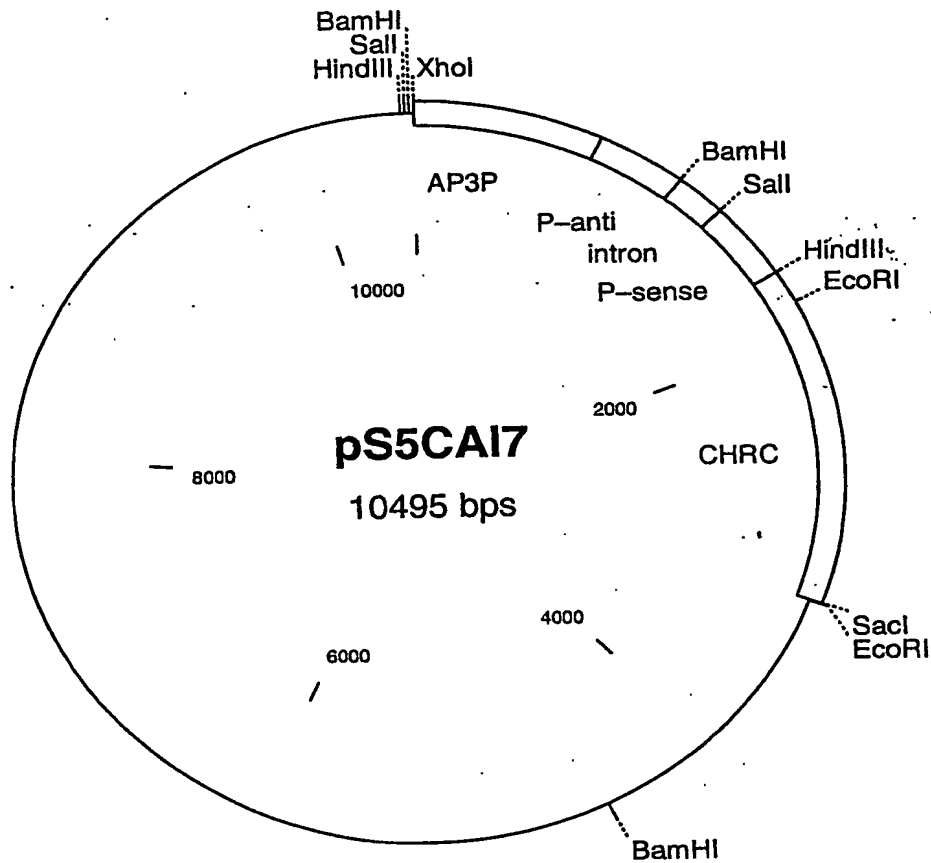


Abbildung 10: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp 5' Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle sowohl des AP3P-Promoters als auch des CHRC-Promoters



## SEQUENCE LISTING

<110> SunGene GmbH & Co KGaA

<120> Verfahren zur Herstellung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten

<130> NAE 439/02

<160> 43.

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 777

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(777)

<223>

<400> 1

```

gagctcactc actgatttcc attgcttgaa aattgatgat gaactaagat caatccatgt 60
tagtttcaaa acaacagtaa ctgtggccaa cttagttttg aaacaacact aactgggtcga 120
agcaaaaaga aaaaagagtt tcatcatata tctgatttga tggactgttt ggagtttagga 180
ccaaacatta tctacaaaca aagacttttc tcttaacttg tgattccttc ttaaacccta 240
ggggtaatat tctattttcc aaggatcttt agttaaggc aaatccggga aattattgta 300
atcatttggg gaaacatata aaagatttga gttagatgga agtgacgatt aatccaaaca 360
tatatatctc tttcttctta tttcccaa ataacagacaa aagtagaata ttggctttta 420
acaccaatat aaaaacttgc ttcacaccta aacacttttg tttacttttag ggtaagtgca 480
aaaagccaac caaatccacc tgcactgatt tgacgtttac aaacgccgtt aagtcgatgt 540
ccgttgattt aaacagtgtc ttgtaattaa aaaaatcagt ttacataaat ggaaaattta 600
tcaacttagtt ttcatcaact tctgaactta cttttcatgg attaggcaat actttccatt 660
tttagtaact caagtggaac ctttacttct tcaactccat ctctctcttt ctatttcact 720
tctttcttct cattatatct cttgtcctct ccaccaaata tcttcaacaa aaagctt 777

```

<210> 2

<211> 195

<212> DNA

<213> Kartoffel



<220>  
 <221> Intron  
 <222> (1)..(195)  
 <223>

<400> 2  
 tacgtaagtt tctgcttcta cctttgatat atatataata attatcatta attagtagta 60  
 atataatatt tcaaataat ttttcaaaat aaaagaatgt agtatatagc aattgctttt 120  
 ctgtagttta taagtgtgta tattttaatt tataactttt ctaatatatg accaaaattt 180  
 gttgatgtgc agctg 195

<210> 3  
 <211> 212  
 <212> DNA  
 <213> kuenstliche Sequenz

<220>  
 <221> Intron  
 <222> (1)..(212)  
 <223>

<400> 3  
 gtgcactacg taagtttctg cttctacctt tgatatatat ataataatta tcattaatta 60  
 gtagtaatat aatatttcaa atattttttt caaaataaaa gaatgtagta tatagcaatt 120  
 gcttttctgt agtttataag tgtgtatatt ttaatttata acttttctaa tatatgacca 180  
 aaatttggtg atgtgcaggt atcacgggat cc 212

<210> 4  
 <211> 1830  
 <212> DNA  
 <213> Tagetes erecta

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (141)..(1691)  
 <223>

<400> 4  
 ggcacgaggc aaagcaaagg ttgtttgttg ttgttggtga gagacactcc aatccaaaca 60  
 gatacaaggc gtgactggat atttctctct cgttcctaac aacagcaacg aagaagaaaa 120  
 agaatcatta ctaacaatca atg agt atg aga gct gga cac atg acg gca aca 173  
 Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr  
 1 5 10

atg gcg gct ttt aca tgc cct agg ttt atg act agc atc aga tac acg Met Ala Ala Phe Thr Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr 15 20 25	221
aag caa att aag tgc aac gct gct aaa agc cag cta gtc gtt aaa caa Lys Gln Ile Lys Cys Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln 30 35 40	269
gag att gag gag gaa gaa gat tat gtg aaa gcc ggt gga tgc gag ctg Glu Ile Glu Glu Glu Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu 45 50 55	317
ctt ttt gtt caa atg caa cag aat aag tcc atg gat gca cag tct agc Leu Phe Val Gln Met Gln Gln Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser 60 65 70 75	365
cta tcc caa aag ctc cca agg gta cca ata gga gga gga gga gac agt Leu Ser Gln Lys Leu Pro Arg Val Pro Ile Gly Gly Gly Gly Asp Ser 80 85 90	413
aac tgt ata ctg gat ttg gtt gta att ggt tgt ggt cct gct ggc ctt Asn Cys Ile Leu Asp Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu 95 100 105	461
gct ctt gct gga gaa tca gcc aag cta ggc ttg aat gtc gca ctt atc Ala Leu Ala Gly Glu Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile 110 115 120	509
ggc cct gat ctt cct ttt aca aat aac tat ggt gtt tgg gag gat gaa Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu 125 130 135	557
ttt ata ggt ctt gga ctt gag ggc tgt att gaa cat gtt tgg cga gat Phe Ile Gly Leu Gly Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp 140 145 150 155	605
act gta gta tat ctt gat gac aac gat ccc att ctc ata ggt cgt gcc Thr Val Val Tyr Leu Asp Asp Asn Asp Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala 160 165 170	653
tat gga cga gtt agt cgt gat tta ctt cac gag gag ttg ttg act agg Tyr Gly Arg Val Ser Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Thr Arg 175 180 185	701
tgc atg gag tca ggc gtt tca tat ctg agc tcc aaa gtg gaa cgg att Cys Met Glu Ser Gly Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile 190 195 200	749
act gaa gct cca aat ggc cta agt ctc ata gag tgt gaa ggc aat atc Thr Glu Ala Pro Asn Gly Leu Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile 205 210 215	797
aca att cca tgc agg ctt gct act gtc gct tct gga gca gct tct gga Thr Ile Pro Cys Arg Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly 220 225 230 235	845
aaa ctt ttg cag tat gaa ctt ggc ggt ccc cgt gtt tgc gtt caa aca	893

Lys	Leu	Leu	Gln	Tyr	Glu	Leu	Gly	Gly	Pro	Arg	Val	Cys	Val	Gln	Thr		
			240						245					250			
941																	
gct	tat	ggt	ata	gag	gtt	gag	gtt	gaa	agc	ata	ccc	tat	gat	cca	agc		
Ala	Tyr	Gly	Ile	Glu	Val	Glu	Val	Glu	Ser	Ile	Pro	Tyr	Asp	Pro	Ser		
			255					260					265				
989																	
cta	atg	gtt	ttc	atg	gat	tat	aga	gac	tac	acc	aaa	cat	aaa	tct	caa		
Leu	Met	Val	Phe	Met	Asp	Tyr	Arg	Asp	Tyr	Thr	Lys	His	Lys	Ser	Gln		
		270					275					280					
1037																	
tca	cta	gaa	gca	caa	tat	cca	aca	ttt	ttg	tat	gtc	atg	cca	atg	tct		
Ser	Leu	Glu	Ala	Gln	Tyr	Pro	Thr	Phe	Leu	Tyr	Val	Met	Pro	Met	Ser		
		285				290					295						
1085																	
cca	act	aaa	gta	ttc	ttt	gag	gaa	act	tgt	ttg	gct	tca	aaa	gag	gcc		
Pro	Thr	Lys	Val	Phe	Phe	Glu	Glu	Thr	Cys	Leu	Ala	Ser	Lys	Glu	Ala		
300				305					310					315			
1133																	
atg	cct	ttt	gag	tta	ttg	aag	aca	aaa	ctc	atg	tca	aga	tta	aag	act		
Met	Pro	Phe	Glu	Leu	Leu	Lys	Thr	Lys	Leu	Met	Ser	Arg	Leu	Lys	Thr		
			320						325					330			
1181																	
atg	ggg	atc	cga	ata	acc	aaa	act	tat	gaa	gag	gaa	tgg	tca	tat	att		
Met	Gly	Ile	Arg	Ile	Thr	Lys	Thr	Tyr	Glu	Glu	Glu	Trp	Ser	Tyr	Ile		
		335						340					345				
1229																	
cca	gta	ggt	gga	tcc	tta	cca	aat	acc	gag	caa	aag	aac	ctt	gca	ttt		
Pro	Val	Gly	Gly	Ser	Leu	Pro	Asn	Thr	Glu	Gln	Lys	Asn	Leu	Ala	Phe		
		350					355					360					
1277																	
ggt	gct	gct	gct	agc	atg	gtg	cat	cca	gcc	aca	gga	tat	tcg	gtt	gta		
Gly	Ala	Ala	Ala	Ser	Met	Val	His	Pro	Ala	Thr	Gly	Tyr	Ser	Val	Val		
		365				370					375						
1325																	
aga	tca	ctg	tca	gaa	gct	cct	aat	tat	gca	gca	gta	att	gca	aag	att		
Arg	Ser	Leu	Ser	Glu	Ala	Pro	Asn	Tyr	Ala	Ala	Val	Ile	Ala	Lys	Ile		
380				385					390					395			
1373																	
tta	ggg	aaa	gga	aat	tca	aaa	cag	atg	ctt	gat	cat	gga	aga	tac	aca		
Leu	Gly	Lys	Gly	Asn	Ser	Lys	Gln	Met	Leu	Asp	His	Gly	Arg	Tyr	Thr		
			400					405						410			
1421																	
acc	aac	atc	tca	aag	caa	gct	tgg	gaa	aca	ctt	tgg	ccc	ctt	gaa	agg		
Thr	Asn	Ile	Ser	Lys	Gln	Ala	Trp	Glu	Thr	Leu	Trp	Pro	Leu	Glu	Arg		
		415					420					425					
1469																	
aaa	aga	cag	aga	gca	ttc	ttt	ctc	ttt	gga	tta	gca	ctg	att	gtc	cag		
Lys	Arg	Gln	Arg	Ala	Phe	Phe	Leu	Phe	Gly	Leu	Ala	Leu	Ile	Val	Gln		
		430				435						440					
1517																	
atg	gat	att	gag	ggg	acc	cgc	aca	ttc	ttc	cgg	act	ttc	ttc	cgc	ttg		
Met	Asp	Ile	Glu	Gly	Thr	Arg	Thr	Phe	Phe	Arg	Thr	Phe	Phe	Arg	Leu		
		445				450					455						
1565																	
ccc	aca	tgg	atg	tgg	tgg	ggg	ttt	ctt	gga	tct	tcg	tta	tca	tca	act		
Pro	Thr	Trp	Met	Trp	Trp	Gly	Phe	Leu	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr		



Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Ile Gly Leu Gly  
 130 135 140

Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp Thr Val Val Tyr Leu  
 145 150 155 160

Asp Asp Asn Asp Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser  
 165 170 175

Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Thr Arg Cys Met Glu Ser Gly  
 180 185 190

Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile Thr Glu Ala Pro Asn  
 195 200 205

Gly Leu Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile Thr Ile Pro Cys Arg  
 210 215 220

Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Gln Tyr  
 225 230 235 240

Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Ile Glu  
 245 250 255

Val Glu Val Glu Ser Ile Pro Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met  
 260 265 270

Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys His Lys Ser Gln Ser Leu Glu Ala Gln  
 275 280 285

Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser Pro Thr Lys Val Phe  
 290 295 300

Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Glu Ala Met Pro Phe Glu Leu  
 305 310 315 320

Leu Lys Thr Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr Met Gly Ile Arg Ile  
 325 330 335

Thr Lys Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser  
 340 345 350

Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser  
 355 360 365

Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu  
 370 375 380

Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala Lys Ile Leu Gly Lys Gly Asn  
 385 390 395 400

Ser Lys Gln Met Leu Asp His Gly Arg Tyr Thr Thr Asn Ile Ser Lys  
 405 410 415

Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala  
 420 425 430

Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln Met Asp Ile Glu Gly  
 435 440 445

Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro Thr Trp Met Trp  
 450 455 460

Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr Asp Leu Ile Ile Phe  
 465 470 475 480

Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser Leu Arg Met Gly Leu  
 485 490 495

Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly Thr Met Leu Lys Ala  
 500 505 510

Tyr Leu Thr Ile  
 515

<210> 6  
 <211> 445  
 <212> DNA  
 <213> tagetes erecta

<220>  
 <221> Sense-Fragment  
 <222> (1)..(445)  
 <223>

<400> 6  
 aagcttgac gagcgaagc aaaggttggt tgttggtggt gttgagagac actccaatcc

aaacagatac aaggcgtgac tggatatttc tctctcgttc ctaacaacag caacgaagaa 120  
 gaaaaagaat cattactaac aatcaatgag tatgagagct ggacacatga cggcaacaat 180  
 ggcggctttt acatgcccta ggtttatgac tagcatcaga tacacgaagc aaattaagt 240  
 caacgctgct aaaagccagc tagtcgttaa acaagagatt gaggaggaag aagattatgt 300  
 gaaagccggt ggatcggagc tgctttttgt tcaaatagcaa cagaataagt ccatggatgc 360  
 acagtctagc ctatcccaaa agctcccaag ggtaccaata ggaggaggag gagacagtaa 420  
 ctgtatactg gatttggttg tcgac 445

<210> 7  
 <211> 446  
 <212> DNA  
 <213> Tagetes erecta

<220>  
 <221> Antisense Fragment  
 <222> (1)..(446)  
 <223>

<400> 7  
 gaattcgac gaggcaaagc aaagggtgtt tggtgtgtt gttgagagac actccaatcc 60  
 aaacagatac aaggcgtgac tggatatttc tctctcgttc ctaacaacag caacgaagaa 120  
 gaaaaagaat cattactaac aatcaatgag tatgagagct ggacacatga cggcaacaat 180  
 ggcggctttt acatgcccta ggtttatgac tagcatcaga tacacgaagc aaattaagt 240  
 caacgctgct aaaagccagc tagtcgttaa acaagagatt gaggaggaag aagattatgt 300  
 gaaagccggt ggatcggagc tgctttttgt tcaaatagcaa cagaataagt ccatggatgc 360  
 acagtctagc ctatcccaaa agctcccaag ggtaccaata ggaggaggag gagacagtaa 420  
 ctgtatactg gatttggttg gaccc 446

<210> 8  
 <211> 393  
 <212> DNA  
 <213> Tagetes erecta

<220>  
 <221> Sense Fragment  
 <222> (1)..(393)  
 <223>

<400> 8

```

aagctttgga ttagcactga ttgtccagat ggatattgag gggacccgca cattcttccg      60
gactttcttc cgcttgccca catggatgtg gtggggggtt cttggatctt cgttatcatc      120
aactgacttg ataatatattg cgttttacat gtttatcata gcaccgcata gcctgagaat      180
gggtctgggt agacatttgc tttctgaccc gacaggagga acaatgttaa aagcgtatct      240
cacgatataa ataactctag tcgcgatcag tttagattat aggcacatct tgcatatata      300
tatgtataaa ccttatgtgt gctgtatcct tacatcaaca cagtcattaa ttgtatttct      360
tggggtaatg ctgatgaagt attttctgtc gac                                     393

```

```

<210> 9
<211> 397
<212> DNA
<213> Tagetes erecta
<220>
<221> AntisenseFragment
<222> (1)..(397)
<223>

```

```

<400> 9
gaattctctt tggattagca ctgattgtcc agatggatat tgagggggacc cgcacattct      60
tccggacttt cttccgcttg cccacatgga tgtgggtgggg gtttcttgga tcttcgttat      120
catcaactga cttgataata tttgcgtttt acatgtttat catagcaccg catagcctga      180
gaatgggtct ggtttagacat ttgctttctg acccgacagg aggaacaatg ttaaaagcgt      240
atctcaogat ataaataact ctagtcgcca tcagttttaga ttataggcac atcttgcata      300
tatatatgta taaaccttat gtgtgctgta tccttacatc aacacagtca ttaattgtat      360
ttcttggggg aatgctgatg aagtatttct tggatcc                                     397

```

```

<210> 10
<211> 1537
<212> DNA
<213> -
<220>
<221> promoter
<222> (1)..(1537)
<223>

```

```

<400> 10
gagctctaca aattagggtt actttattca ttttcatcca ttctctttat tgttaaattt      60
tgtacattta ttcaataata ttatatgttt attacaaatt ctcactttct tattcatacc      120

```



tattcactca agcctttacc atcttccttt tctattttcaa tactattttct acttcatttt 180  
 tcacgttttt aacatctttc tttattttctt gtccacttcg tttagggatg cctaattgtcc 240  
 caaattttcat ctctcgtagt aacacaaaac caatgtaatg ctactttctct ctacattttt 300  
 aatacaaaata aagtgaacaa aatatcttat aaataaacia atatataat tttgttagac 360  
 gctgtctcaa cccatcaatt aaaaaatttt gttatatttc tactttacct actaaatttg 420  
 tttctcatat ttacctttta acccccacaa aaaaaaatta taaaaaagaa agaaaaaagc 480  
 taaaccctat ttaaataagct aactataaga tcttaaaatt atcctcatca gtgtatagtt 540  
 taattgggta ttaacttata acattatata tctatgacat atactctctc ctagctattt 600  
 ctcacatttt ttaacttaag aaaatagtca taacatagtc taaaattcaa acatccacat 660  
 gctctaattt gattaacaaa aagttagaaa tattttattta aataaaaaag actaataaat 720  
 atataaaatg aatgttcata cgcagaccca tttagagatg agtatgcttt cacatgctga 780  
 gattattttc aaaactaagg ttgtagcaat attaaatcaa taaaattatt ataaataaca 840  
 aaattaacct gctcgtggtt gctgtatatg ggaggctaca aaataaatta aactaaagat 900  
 gattatgttt tagacatttt ttctatctgt attagtttat acatattaat tcaggagctg 960  
 cacaacccaa ttctattttc gttccttggt ggctggggtt ctcacaagg tcaatagtca 1020  
 atattagggt ttattggact ttaataagta tcaacaaaat ctatgtgtga acttaaaaat 1080  
 tgtattaaat atttagggta acctgttgcc gtttttagaa taatgtttct tcttaataca 1140  
 cgaaagcgta ttgtgtattc attcatttgg cgcctcacat gcttcgggtg gctcgttta 1200  
 gtctctgcct tctttgtata ttgtactccc cctcttccta tgccacgtgt tctgagctta 1260  
 acaagccacg ttgcgtgcca ttgccaaaca agtcatttta acttcacaag gtccgatttg 1320  
 acctccaaaa caacgacaag tttccgaaca gtcgcgaaga tcaagggtat aatcgtcttt 1380  
 ttgaattcta tttctcttta ttaataagtc cctctcgtgt gatagttttt aaaagatttt 1440  
 taaaacgtag ctgctgttta agtaaatoct agtccttcag tttgtgcttt tgtgtgtttt 1500  
 gtttctctga ttacggaat ttggaaataa taagctt 1537

<210> 11  
 <211> 734  
 <212> DNA  
 <213> kuenstliche Sequenz

<220>  
 <221> variation

<222> (1)..(734)  
<223>

<400> 11  
ctaacaatca atgagtagag agctggacac atgacggcaa caatggcggc ttttacatgc 60  
cctagggttta tgactagcat cagatacacg aagcaaatta agtgcaacgc tgctaaaagc 120  
cagctagtcg ttaaacaaga gattgaggag gaagaagatt atgtgaaagc cgggtggatcg 180  
gagctgcttt ttgttcaa at gcaacagaat aagtccatgg atgcacagtc tagcctatcc 240  
caaaagggtca ctccagactt aattgcttat aaataaataa atatgttttt taggaataat 300  
gatattttaga tagattagct atcacctgtg ctgtgggtgtg cagctcccaa gggctcttacc 360  
gatagtaaaa tcgttagtta tgattaatac ttgggagggtg ggggattata ggctttgttg 420  
tgagaatggt gagaaagagg ttgacaaat cgggtgttga atgagggtta atggagtta 480  
attaaaataa agagaagaga aagattaaga gggatgatgg gatattaaag acggscaata 540  
tagtgatgcc acgtagaaaa aggtaagtga aaacatacaa cgtggcttta aaagatggct 600  
tggttgctaa tcaactcaac tcaactcata tcctatccat tcaaattcaa ttcaattcta 660  
ttgaatgcaa agcaaagcaa aggttgtttg ttgttgttgt tgagagagac tccaatccaa 720  
acagatacaa ggcg 734

<210> 12  
<211> 280  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> variation  
<222> (1)..(280)  
<223>

<400> 12  
gtcgagtatg gagttcaatt aaaataaaga gaagaraaag attaagaggg tgatggggat 60  
attaaagacg gccaatrtag tgatgccacg taagaaaaag gtaagtgaac acatacaacg 120  
tggttttaaa agatggcttg gctgctaata aactcaactc aactcatatc ctatccattc 180  
aaattcaatt caattctatt gaatgcaaag caaagcaaag caaagggttg ttgttgttgt 240  
tggttgagaga cactccaatc caaacagata caaggcgtga 280

<210> 13  
<211> 358

<212> DNA  
 <213> Tagetes erecta

<220>  
 <221> (Sense) Promotor  
 <222> (1)..(358)  
 <223>

<400> 13  
 aagcttaccg atagtaaaat cgtaggttat gattaatact tgggaggtgg gggattatag 60  
 gctttgttgt gagaatgttg agaaagaggt ttgacaaatc ggtgtttgaa tgagggttaa 120  
 tggagtttaa ttaaaataaa gagaagagaa agattaagag ggtgatgggg atattaaaga 180  
 cggccaatat agtgatgcca cgtagaaaaa ggtaagtga aacatacaac gtggccttaa 240  
 aagatggctt ggctgctaata caactcaact caactcatat cctatccatt caaattcaat 300  
 tcaattctat tgaatgcaaa gcaaagcaaa gcaaagggtt tttgttggtt ttgtcgac 358

<210> 14  
 <211> 361  
 <212> DNA  
 <213> Tagetes erecta

<220>  
 <221> (Antisense) Promotor  
 <222> (1)..(361)  
 <223>

<400> 14  
 ctcgagctta ccgatagtaa aatcgtagt tatgattaat acttgggagg tgggggatta 60  
 taggccttgt tgtgagaatg ttgagaaaga ggtttgacaa atcgggtgtt gaatgaggtt 120  
 aaatggagtt taattaaaat aaagagaaga gaaagattaa gaggggtgatg gggatattaa 180  
 agacggccaa tatagtgatg ccacgtagaa aaaggtaagt gaaaacatac aacgtggctt 240  
 taaaagatgg cttggctgct aatcaactca actcaactca taccctatcc attcaaattc 300  
 aattcaattc tattgaatgc aaagcaaagc aaagcaaagg ttgtttgttg ttgttgatc 360  
 c 361

<210> 15  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> kuenstliche Sequenz

<220>  
 <221> Primer

<222> (1)..(28)  
<223>

<400> 15  
gagctcactc actgatttcc attgcttg

28

<210> 16  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(37)  
<223>

<400> 16  
cgccggttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc

37

<210> 17  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(34)  
<223>

<400> 17  
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac

34

<210> 18  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(25)  
<223>

<400> 18  
taagcttttt gttgaagaga tttgg

25

<210> 19  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(23)  
<223>

<400> 19  
gaaaataactt catcagcatt acc

23

<210> 20  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(28)  
<223>

<400> 20  
gtcgactacg taagtttctg cttctacc

28

<210> 21  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(26)  
<223>

<400> 21  
ggatccggtg atacctgcac atcaac

26

<210> 22  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(28)  
<223>

<400> 22  
aagcttgac gaggcaaagc aaagggtg

28

<210> 23

<211> 29  
 <212> DNA  
 <213> kuenstliche Sequenz

<220>  
 <221> Primer  
 <222> (1)..(29)  
 <223>

<400> 23  
 gtcgacaacc aaatccagta tacagttac

29

<210> 24  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> kuenstliche Sequenz

<220>  
 <221> Primer  
 <222> (1)..(30)  
 <223>

<400> 24  
 aggatccaac caaatccagt atacagttac

30

<210> 25  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> kuenstliche Sequenz

<220>  
 <221> Primer  
 <222> (1)..(28)  
 <223>

<400> 25  
 gaattcgac gagggcaaagc aaagggttg

28

<210> 26  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> kuenstliche Sequenz

<220>  
 <221> Primer  
 <222> (1)..(25)  
 <223>

<400> 26  
 aagcttttga ttagcactga ttgtc

25

<210> 27  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(29)  
<223>

<400> 27  
gtcgacagaa aatacttcat cagcattac

29

<210> 28  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(29)  
<223>

<400> 28  
ggatccagaa aatacttcat cagcattac

29

<210> 29  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(27)  
<223>

<400> 29  
gaattctctt tggattagca ctgattg

27

<210> 30  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(23)  
<223>

<400> 30  
cgcccttgat ctgtttggat tgg

23

<210> 31  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(24)  
<223>

<400> 31  
ctaacaatca atgagtatga gagc

24

<210> 32  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(26)  
<223>

<400> 32  
agagcaaggc cagcaggacc acaacc

26

<210> 33  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(26)  
<223>

<400> 33  
ccttgggagc ttttgggata ggctag

26

<210> 34  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer



<222> (1)..(26)  
<223>

<400> 34  
tcacgccttg tatctgtttg gattgg

26

<210> 35  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(15)  
<223>

<400> 35  
gtcgagtatg gagtt

15

<210> 36  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(28)  
<223>

<400> 36  
aagcttaccg atagtaaaat cgtttagtt

28

<210> 37  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(31)  
<223>

<400> 37  
ctcgagctta ccgatagtaa aatcgttagt t

31

<210> 38  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(28)  
<223>

<400> 38  
gtcgacaaca acaacaaaca acctttgc

28

<210> 39  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(28)  
<223>

<400> 39  
ggatccaaca acaacaaaca acctttgc

28

<210> 40  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(28)  
<223>

<400> 40  
gtcgactttt tgttgaagag atttggtg

28

<210> 41  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(28)  
<223>

<400> 41  
ctcgagactc actgatttcc attgcttg

28

<210> 42

<211> 22  
 <212> DNA  
 <213> kuenstliche Sequenz

<220>  
 <221> Primer  
 <222> (1)..(22)  
 <223>

<400> 42  
 gagctctaca aattagggtt ac

22

<210> 43  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> kuenstliche Sequenz

<220>  
 <221> Primer  
 <222> (1)..(23)  
 <223>

<400> 43  
 aagcttatta tttccaaatt ccg

23

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP04/008624

International filing date: 31 July 2004 (31.07.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: EP  
Number: PCT/EP/03/09105  
Filing date: 18 August 2003 (18.08.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 24 January 2005 (24.01.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**